

AGRADECIMENTOS

- ✓ À Prof. Doutora Eng.^a Maria Isabel Januário, minha orientadora, pelo apoio incondicional e esclarecimento de todas as dúvidas e questões que foram surgindo ao longo da elaboração desta dissertação. O seu apoio, dedicação, orientação, conhecimentos e amizade foram indispensáveis e sem a sua presença, a execução deste não teria sido possível.
- ✓ À Doutora Eng.^a Sara Beirão da Costa, minha co-orientadora, pelo apoio, disponibilidade permanente e esclarecimento demonstrados ao longo deste trabalho.
- ✓ À Prof. Doutora Eng.^a Maria Luísa Beirão da Costa, pelo apoio e disponibilidade demonstrados, e pelo seu profundo conhecimento nas temáticas abordadas.
- ✓ À Eng.^a Cláudia Duarte, bolseira do projecto em questão, pelo apoio, paciência, ajuda e disponibilidade incondicional.
- ✓ À Palmira, secretária da Secção de Agronomia Tropical pela companhia, apoio, amizade, alegria e boa disposição, sempre demonstrados.
- ✓ Aos meus colegas de curso pelo apoio, amizade e companhia transmitidos, que contribuíram directa ou indirectamente para a conclusão deste trabalho. E ainda às minhas grandes amigas (Filipa Marques, Inês Guedes e Mara Carvalheira), pela amizade, companhia, força e por todos os momentos que passei com elas
- ✓ À minha família, principalmente à minha avó Ivone, tios e primos pelo apoio incondicional, dedicação, amizade e afecto constante, pois sem eles nada disto seria possível.
- ✓ E sem esquecer do Miguel, meu namorado pela dedicação, compreensão, força e amor, que desde o início sempre me apoiou, e nunca me deixou desistir.

Um grande Obrigado a todos!

RESUMO

A inulina e os FOS são compostos prebióticos, e deste modo o crescente interesse nestes constituintes naturais tem aumentado na última década, e suscitado a atenção por parte da indústria alimentar. Por outro lado, as suas propriedades, nomeadamente a capacidade de formação de cápsulas, permite a sua utilização como agente encapsulante. A presente dissertação pretendeu estudar a inulina, como matriz encapsulante de compostos bioactivos, para o que se recorreu a processos de secagem por liofilização e atomização. Os ensaios efectuados mostraram que o processo de atomização é o mais eficaz na formação de cápsulas de inulina. O diâmetro médio das partículas formadas variou entre 3 e 5 μm , e observou-se que o diâmetro diminui à medida que o grau de polimerização aumenta. De forma a otimizar o diâmetro e outras características das partículas, foram testadas diferentes condições de secagem, elaborando-se uma matriz de inulina. A concentração de sólidos solúveis e a temperatura de secagem foram as variáveis estudadas. Através da metodologia de superfície de resposta, verificou-se que ambas as variáveis têm influência sob o diâmetro de partícula, mas a concentração de sólidos apresentou uma maior influência. O encapsulamento do óleo de orégão comprovou que a inulina é um eficiente agente encapsulante.

Palavras-chave: inulina, fruto-oligossacáridos, encapsulamento, óleo essencial de orégão, atomização, liofilização.

ABSTRACT

Inulin and fructo-oligosaccharides are prebiotic compounds and, for that reason, the growing interest in these natural constituents has been increasing in the last decade, raising the attention of food industry. On the other hand, their properties, namely the ability of capsule formation, allow their use as encapsulation material. This thesis was to study inulin as an encapsulating matrix of bioactive compounds, for what there were used drying processes by spray-drying and freeze-drying. The tests done have shown that the atomization process is the most efficient in the formation of inulin capsules. The size of the particles formed, ranged between 3 and 5 μm , and it was observed that their size decreases as the polymerization degree increases. So, to optimize the particles' size and other characteristics, there were tested different drying conditions, and so it was done an inulin matrix. The concentration of soluble solids and the drying temperature were the studied variables. Trough the response surface methodology, it was verified that both variables have influence on the particles' size, although the solids concentration showed a bigger influence. The encapsulation of oregano oil has showed that inulin is an effective encapsulating agent.

Key-words: inulin, fructo-oligosaccharides, encapsulation, essential oregano oil, spray-drying, freeze-drying.

EXTENDED ABSTRACT

The prebiotic compounds are food ingredients that cannot be digested by the human organism, affecting in a benefic way their host, stimulating selectively the growth and/or the activity of some colon bacteria, and so, having benefic effects on the host's health. Inside these prebiotic compounds are inulin and fructo-oligosaccharides. Because of their health benefits and their varied technologic properties, the interest in these natural constituents has been increasing in the last decade, raising the attention of the food industry.

In addition to these properties, these compounds have the ability to form microcapsules, allowing their use as bioactive compounds' encapsulating material, namely antioxidants, aromatic compounds (essential oils), vitamins, among others.

An effective way of incorporating these bioactive compounds into food is by encapsulation. This method is already used for several years, so, not a recent technology in the food industry. Inside the encapsulation techniques, atomization is the most used technology due to low cost and the availability of equipment, but also because of its high efficiency in the production of good quality capsules. Apart from being used as encapsulation method, it's also considered as a physical process applied to dehydrate liquid aliments.

Freeze-drying is another drying method, mostly used in the preservation/conservation of more sensitive foods (liquid or solid), keeping practically unchanged all their constituents.

This thesis was to study inulin, as bioactive compounds' encapsulating matrix. As it's not possible, in useful time, to use bioactive compounds, it was used essential oregano oil as model to test inulin as encapsulating material.

Initially, it was evaluated the ability to form inulin capsules using two processes: atomization and freeze-drying. Commercial inulin and inulin extracts obtained in the laboratory were used as materials.

The results obtained in the preliminary tests, showed that the atomization process is the more effective in inulin capsules' formation, by the achievement of a particles' size between 3 and 5 μm . In consequence, in the following of the experimental work, the freeze-drying technique as a bioactive compounds' encapsulation method using inulin as encapsulating material, was excluded. On the other hand, it was tried relating the polymerization degree of this fructose polymer with the size of the formed particle. It was verified in the inulin exctrats obtained in the laboratory, a tendency in the particle's size to decrease when the polymerization degree increases. In the commercial samples this tendency was also observed, although less pronounced.

In the second part of these experimental tests, and as way of optimizing the size among other characteristics of the particles, namely the particle's surface, there were tested different drying conditions. It was elaborated an inulin matrix comprising eleven tests, where there were selected as independent variables the drying temperature (120-190°C) and the soluble solids' concentration (5-25%).

Trough the response surface methodology (RSM) it was verified that both variables influence the particle's size, being more marked the effect of soluble solids in this characteristic. The results showed that when the soluble solids' concentration increases, the formed particles' size increases with it. It was observed the opposite, though, in the drying temperature. But for the particle's surface, this becomes more and more smooth and homogeneous with the increasing of the temperature. The sizes observed in all the tests varied between 3,1 and 4,2 μm , however in some of the tests there were particles with dimensions between 7 and 15 μm , although it's not a representative class.

On the tests done with the oregano oil encapsulation, it was observed the encapsulations' formation. Using Fluorescence Confocal Microscope it was confirmed that the oregano oil was effectively encapsulated in inulin microcapsules. The sizes observed on the encapsulations varied between 6,2 and 9,2 μm . So, the conclusion was that inulin is a potential encapsulating agent of bioactive composures. For this tests, it was done an inulin matrix for the second time, and trough the response surface methodology (RSM) it was verified that both variables (SS concentration and temperature) had influence on the encapsulations' sizes.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
EXTENDED ABSTRACT	iv
ÍNDICE GERAL	vi
LISTA DE QUADROS	xii
INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS	1
I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. Inulina.....	3
1.1. Características físico-químicas	3
1.2. Propriedades tecnológicas.....	5
1.3. Propriedades funcionais.....	6
1.3.1. Efeitos no sistema gastrointestinal – Conceito de fibra alimentar	7
1.3.2. Controlo do peso corporal e efeitos no metabolismo glucídico	14
1.3.3. Efeitos no balanço mineral e vitamínico	15
1.3.4. Efeitos no metabolismo lipídico	16
1.4. Aplicações Alimentares.....	16
1.5. Fontes de inulina e FOS	19
2. Chicória como principal fonte de inulina	21
2.1. Classificação botânica e morfológica	23
2.2. A Cultura.....	25

3. Métodos de obtenção laboratorial e industrial de inulina.....	28
3.1. Produção industrial de inulina	28
3.2. Obtenção laboratorial de inulina.....	29
3.2.1. Extracção aquosa de inulina.....	29
3.2.2. Liofilização dos extractos para obtenção de inulina em pó	29
4. Encapsulamento de Compostos Bioactivos	30
4.1. Técnicas de encapsulamento.....	33
4.2. Encapsulamento por atomização	33
4.3. Materiais utilizados em encapsulamento.....	39
4.4. Inulina como agente encapsulante.....	41
4.5. Compostos bioactivos.....	43
II – PARTE EXPERIMENTAL.....	45
1. Ensaio Preliminares de preparação da inulina como agente encapsulante.....	45
1.1. Material.....	45
1.2. Metodologia	46
1.2.1. Preparação das amostras comerciais de inulina.....	46
1.2.2. Obtenção de inulina no laboratório	47
1.2.3. Atomização das amostras de inulina	48
1.2.4. Liofilização das amostras comerciais como alternativa à atomização.....	48
1.2.5. Visualização das amostras por Microscopia Electrónica de Varrimento	48
2. Optimização das condições de formação das microcápsulas de inulina	49
2.1. Material.....	49

2.2. Metodologia de Superfície de Resposta (RSM)	50
3. Encapsulamento de compostos bioactivos, usando como modelo óleo essencial de orégão.....	50
3.1. Material.....	51
3.2. Metodologia	51
3.2.1. Preparação da emulsão óleo:inulina e encapsulamento.....	51
4. Resultados e discussão.....	52
4.1. Ensaio preliminares.....	52
4.1.1. Estrutura das amostras comerciais e dos extractos de inulina nativa	52
4.1.2. Comparação estatística das amostras.....	57
4.2. Optimização das condições de formação das cápsulas de inulina	58
4.3. Encapsulamento de óleo de orégão em matriz de inulina	64
4.3.1. Verificação dos encapsulados por Microscopia Confocal de Fluorescência ...	64
4.3.2. Verificação e avaliação da microestrutura dos encapsulados por MEV	66
III – CONCLUSÕES	76
IV – REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	78
VI – ANEXOS.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da sacarose (GF) e da inulina, nas diferentes formas de apresentação (GFn e Fm).	4
Figura 2 – Efeito simbiótico entre probióticos e prebióticos.	8
Figura 3 – Descrição dos diversos benefícios dos prebióticos, no tracto gastrointestinal de mamíferos e os seus efeitos sistémicos. GLP-1: “glucagon-like peptide-1” (gene humano que reside no cromossoma 6); Gpr41: “G-protein coupled receptor 41”.	11
Figura 4 – Esquematização dos diferentes locais do cólon onde inulina/FOS são fermentados	12
Figura 5 – Efeitos benéficos na saúde provocados pelas bifidobactérias.	13
Figura 6 – Cichorium intybus L.: (A) Chicória “selvagem”, (B) Chicória industrial.	24
Figura 7 – Evolução da área cultivada de chicória a nível mundial.	26
Figura 8 – Produção europeia de raízes de chicória no ano de 2007.	26
Figura 9 – Produção e área cultivada na Bélgica e França.	27
Figura 10 – Morfologia dos diferentes tipos de microcápsulas.	32
Figura 11 – Esquematização do atomizador pneumático utilizado na elaboração dos ensaios deste trabalho, com o pormenor do jacto atomizador.	35
Figura 12 – Ilustração das possíveis formas do encapsulamento de aromas. A – Microcápsula; B – Microesfera.	43
Figura 13 – Esquematização do microscópio electrónico de varrimento.	49
Figura 14 – Imagens obtidas por MEV (ampliações 100X e 150X) das amostras comerciais de inulina: A – Fibrulose 97 (Cosucra), B – Frutafit (Sensus), C – Baneo HPX (Orafti) e D – Raftiline (Orafti).	53
Figura 15 – Microestrutura e distribuição de frequências das amostras comerciais de Fibrulose 97 (1), Baneo HPX (2) e Raftiline ST (3) (MEV, ampliação 1000x).	54

Figura 16 – Microestrutura e distribuição de frequências dos extractos de inulina nativa total (4) e de maior grau de polimerização (5) (MEV, ampliação 1000x).	55
Figura 17 – Microestrutura das amostras comerciais liofilizadas: (A) Fibrulose 97 e (B) Baneo HPX (MEV, ampliação 200X).	56
Figura 18 – Microestrutura da inulina nativa total liofilizada (MEV, ampliação 500x).	56
Figura 19 – Gráfico dos diâmetros médios de partícula e intervalos de confiança em torno da média.	57
Figura 20 – Microestruturas e distribuições de frequências do 1º ao 4º ensaio da matriz de inulina.	59
Figura 21 – Microestruturas e distribuições de frequências do 5º ao 8º ensaio da matriz de inulina.	60
Figura 22 – Microestruturas e distribuições de frequências do 9º e 10º ensaio da matriz de RSM.	60
Figura 23 – Superfície de resposta para o modelo do diâmetro médio de partícula (variável dependente), em função das variáveis independentes (concentração de sólidos solúveis e temperatura de secagem) da matriz de inulina.	63
Figura 24 – Imagens captadas digitalmente por microscopia confocal dos encapsulados de inulina com óleo de orégão: A – Microcápsulas de inulina que emitem fluorescência azul no espectro visível; B – Óleo de orégão (devido à adição do β -caroteno) e inulina com fluorescência verde no espectro visível C – Sobreposição das duas imagens anteriores (partículas de inulina com óleo de orégão no seu interior).	65
Figura 25 – Microestrutura dos encapsulados de inulina com óleo de orégão (1º, 2º, 3º e 4º ensaios da matriz - MEV, ampliação 200X).	66
Figura 26 – Microestrutura dos encapsulados de inulina com óleo (5º, 6º, 7º e 8º ensaios da matriz - MEV, ampliação 200X).	67
Figura 27 – Microestrutura dos encapsulados de inulina com óleo (9º e 10º ensaios da matriz - MEV, ampliação 500X).	69
Figura 28 – Ilustração da medição dos diâmetros médios.	69

Figura 29 – Microestruturas e distribuições de frequências do 1º ao 4º ensaio da matriz de inulina com óleo.	70
Figura 30 – Microestruturas e distribuições de frequências do 5º ao 8º ensaio da matriz de inulina com óleo.	71
Figura 31 – Microestruturas e distribuições de frequências dos pontos centrais da matriz (9º e 10º ensaios).	72
Figura 32 – Superfície de resposta para o modelo do diâmetro médio de partícula (variável dependente), em função das variáveis independentes (concentração de sólidos solúveis e temperatura de secagem), da matriz de inulina com óleo.....	74
Figura 33 – Superfície de resposta da matriz de inulina com óleo (com rotação para a direita na horizontal).	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Valores calóricos de alguns glúcidos referidos à matéria seca.	14
Quadro 2 – Propriedades tecnológicas e nutricionais resultantes da adição de inulina/oligofrutose em determinados produtos alimentares.	18
Quadro 3 – Consumo alimentar de inulina e oligofrutose.	18
Quadro 4 – Teores médios de inulina e FOS (% de matéria fresca) de algumas plantas habitualmente consumidas.	19
Quadro 5 – Ocorrência e distribuição de fruto-oligossacáridos em plantas comestíveis	20
Quadro 6 – Rendimento (t/ha) e conteúdo (%) em inulina na dália, tupinambo e chicória	20
Quadro 7 – Algumas formulações de inulina comercial no mercado actual.	21
Quadro 8 – Composição das raízes de chicória fresca e seca.	22
Quadro 9 – Evolução no Mundo e na Europa da produção de raízes de chicória (t), entre 2003 e 2007.	27
Quadro 10 – Principais razões para o encapsulamento de ingredientes alimentares	31
Quadro 11 - Características de alguns processos de encapsulamento	44
Quadro 12 – Composição (em % matéria seca) e propriedades tecnológicas, das amostras comerciais utilizadas na elaboração dos ensaios preliminares.	46
Quadro 13 – Sequência dos ensaios elaborados para a matriz de inulina.	50
Quadro 14 – Sequência dos ensaios da matriz de inulina com óleo.	51
Quadro 15 – Significância dos coeficientes de regressão do modelo obtido por RSM (utilizando a média aritmética como resposta).	62
Quadro 16 – Comparação dos diâmetros médios das microcápsulas para as duas matrizes elaboradas.	72

Quadro 17 – Significância dos coeficientes de regressão do modelo obtido por RSM (utilizando a média aritmética como resposta).....73

Quadro 18 – Tabela resumo da ANOVA a dois factores (concentração de sólidos solúveis com três níveis; temperatura de secagem com 3 níveis), utilizando a média aritmética como resposta.73

LISTA DE ABREVIATURAS

- AACC – American Association of Cereal Chemists
- Dm – Diâmetro médio
- F – Molécula de frutose
- Fi – Frutose proveniente da hidrólise de inulina
- FOS – Fruto-oligossacáridos
- FUFOSE - The European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe
- G – Molécula de glucose
- GF – Molécula de sacarose
- GF_n ou F_m – Estrutura química das frutanas, onde n e m representam o número de moléculas de frutose (F), e (G) a molécula terminal de glucose (n, m ≥ 2)
- Gi – Glucose proveniente da hidrólise da inulina
- GP – Grau de Polimerização
- GPm – Grau de Polimerização médio
- GRAS – Generally Recognized as Safe
- IFSTIST – Institute of Food Science and Technology Information Statement
- ILSI Europe – International Life Sciences Institute
- Média A – Média Aritmética
- Média P – Média Ponderada
- PE – Poder Edulcorante
- Rpm – Rotações por minuto
- RSM – Response Surface Methodology (Metodologia de Superfície de Resposta)
- SCFA – Short Chain Fatty Acids (Ácidos Gordos de Cadeia Curta)
- MEV – Microscopia Electrónica de Varrimento
- SS – Sólidos Solúveis

INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

Mundialmente existe uma grande preocupação com a saúde e com os hábitos alimentares da população em geral. Tem-se apostado bastante na investigação e no desenvolvimento de novos produtos alimentares, nomeadamente em alimentos mais saudáveis e com propriedades especialmente benéficas para a saúde. De entre os novos produtos destacam-se os chamados alimentos funcionais. A definição exacta de alimento funcional não é universal, mas a “European Commission’s Concerted Action on Food Science” na Europa (FU_FOSE), coordenada pelo “ILSI Europe”, tem procurado desde 1992 encontrar um consenso para a designação científica. Uma das possíveis definições de alimentos funcionais é:

- Um alimento pode ser considerado funcional se forem demonstrados satisfatoriamente os seus efeitos benéficos, numa ou mais funções fisiológicas do organismo para além dos efeitos nutricionais que possui, de modo a ser relevante no melhoramento da saúde e bem-estar, e/ou na redução do risco de doenças. Um alimento funcional não deve deixar de ser alimento, e os seus efeitos devem ser demonstrados em quantidades aceitáveis para o consumidor: não é um comprimido ou uma cápsula, mas parte dos ingredientes que constituem um alimento (Roberfroid, 2002).

Cada dia que passa aumenta o interesse dos investigadores por esta área da nutrição, e por isso são cada vez maiores os desenvolvimentos no campo dos ingredientes alimentares funcionais (ex: probióticos, prebióticos, simbióticos e outros).

As frutanas do tipo inulina (inulina e oligofrutose) encontram-se entre os prebióticos existentes. Estes são constituintes funcionais naturalmente presentes ou adicionados (ingredientes alimentares), em muitos alimentos habitualmente consumidos. A sua natureza química e a combinação entre os seus efeitos fisiológicos e nutricionais afectam as funções gastrointestinais. Por este motivo, procura-se há já várias décadas extrair (ou isolar) estes constituintes das suas fontes naturais, de forma a torná-los mais disponíveis ao consumo humano, incorporando-os em diversos alimentos.

Actualmente vivemos na Era das nano/micro tecnologias, sendo esta uma das áreas com maior desenvolvimentos. Uma forma de proteger alguns ingredientes alimentares funcionais, para posterior incorporação na alimentação humana, é através do seu encapsulamento. A maioria dos compostos bioactivos com interesse para incorporar em alimentos apresenta instabilidade e degradam-se por acção de factores físicos como a luz, o oxigénio, ou a humidade e daí a importância do seu encapsulamento.

No mercado internacional já existem algumas formas de inulina comercial, cujo objectivo é incorpora-la em produtos alimentares, de forma a aumentar o consumo de prebióticos. Mas esta forma de inulina tem sido utilizada apenas como um ingrediente funcional, e não como um possível veículo de outros compostos bioactivos.

O presente trabalho é constituído por uma primeira parte onde se dá conta do conhecimento actual sobre os aspectos referidos e outros relacionados, com base num levantamento bibliográfico efectuado sobre esta temática. Numa segunda parte (parte experimental), teve-se como objectivo estudar a viabilidade da utilização da inulina como agente encapsulante de outros compostos com interesse para a indústria alimentar, tendo sobretudo em consideração a forma e dimensão dos encapsulados

O trabalho foi elaborado no âmbito da investigação desenvolvida no projecto “Nanoencapsulamento e libertação controlada de compostos bioactivos na melhoria da qualidade dos alimentos e saúde humana”, financiado pela FCT.

O objectivo deste trabalho era estudar o comportamento da inulina como agente encapsulante de compostos bioactivos diversos. Contudo não foi possível em tempo útil a concretização total deste objectivo, pelo que se utilizou apenas o óleo essencial de orégão como modelo, para testar a inulina como agente encapsulante.

I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Inulina

A inulina é um polissacárido de reserva, e encontra-se presente em mais de 30.000 espécies vegetais. Faz parte da alimentação humana em vários países, principalmente na União Europeia. Industrialmente, é obtida a partir de raízes de chicória e é utilizada como um ingrediente alimentar funcional, oferecendo uma combinação única entre benefícios nutricionais, assim como propriedades a nível tecnológico.

O cientista alemão Rose foi quem isolou pela primeira vez, em 1804, uma “substância peculiar”, a partir de um extracto aquoso de *Inula helenium*, e que mais tarde foi denominada inulina por Thomson, em 1818 (Franck, 2006).

Julius Sachs, um fisiologista de plantas alemão, em 1864, foi pioneiro na pesquisa das frutanas. Através de um simples microscópio conseguiu detectar esferas de inulina nas raízes de *Dahlia*, *Heleanthus tuberosus* (Tupinambo) e *Inula helenium* após precipitação por etanol (Franck, 2006).

1.1. Características físico-químicas

A inulina e os fruto-oligossacáridos (FOS) ou oligofrutose pertencem à classe de glúcidos de reserva, conhecidos como frutanas. São componentes naturais em várias plantas edíveis como os frutos e vegetais, e que fazem parte da alimentação humana. Cerca de 15% de espécies vegetais com floração, armazenam as frutanas como reserva em pelo menos um dos seus órgãos, durante um ciclo de vida (Hendry, 1993)

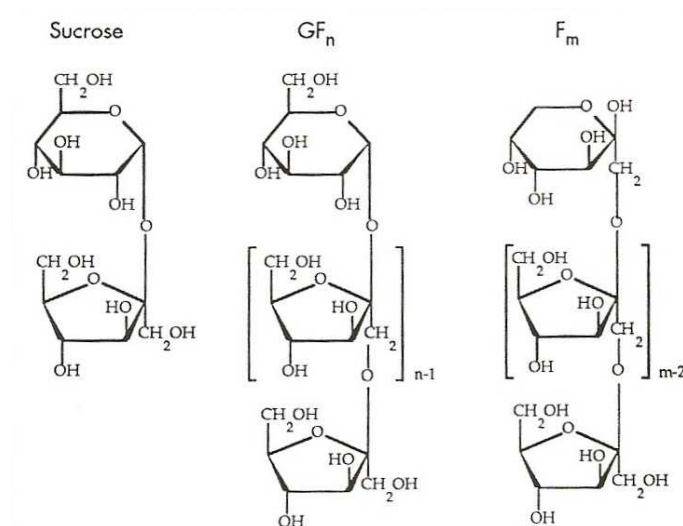
As espécies vegetais que contêm frutanas estão presentes tanto em famílias de mono como dicotiledóneas, tais como as *Liliaceae* (alho porro, alho, cebola e espargos), *Amaryllidaceae*, *Gramineae* e *Compositae* (tupinambo, chicória e yacon) (Kaur & Gupta 2002; Franck, 2006).

O termo frutana é em geral utilizado para qualquer glúcido que possua ligações do tipo fructosil-frutose, constituído maioritariamente por cadeias glicosídicas. As frutanas são polímeros de frutose lineares ou ramificados. Nas dicotiledóneas estão presentes na forma de inulina, composto linear de ligações glicosídicas do tipo $\beta(2\rightarrow1)$, entre unidades de frutose e nas monocotiledóneas apresentam ligações do tipo $\beta(2\rightarrow1)$, assim como ramificações $\beta(2\rightarrow6)$ (Januário, 1999).

O grau de polimerização (GP) da inulina de chicória pode variar entre 2 a 60 unidade de frutose conforme a fonte vegetal, dependendo também da data de colheita e do tempo de armazenamento da matéria-prima (Januário, 1999).

Por definição as frutanas com grau de polimerização inferior a 10 são designadas por fruto-oligosacáridos (ou oligofrutose), e as que apresentam GP superior a 10 denominam-se de inulina (Januário, 1999; Cui, 2005; Franck, 2006)

A estrutura química da inulina pode ser representada pelas seguintes formas: GF_n (cesto-n-oses) ou F_m (inulo-n-oses), onde F corresponde ao número de unidades de frutose ligadas a uma unidade terminal de glucose (G), e n ou m ao número de ligações entre as unidades de frutose (n, m ≥ 2). Isto significa que a inulina é uma mistura de oligómeros e polímeros de frutose. A estrutura molecular da inulina encontra-se representada na Figura 1.



Fonte: Izydorczyk, 2005

Figura 1 – Estrutura química da sacarose (GF) e da inulina, nas diferentes formas de apresentação (GF_n e F_m).

Cerca de 10% da inulina nativa de chicória apresenta um grau de polimerização entre 2 a 5 unidades de frutose, correspondendo a fruto-oligosacáridos, e em regra é constituída por 85-90% de frutose e 10-15% de glucose.

A inulina pode ser hidrolisada a temperaturas elevadas (70-80°C) em meio ácido, e por via enzimática através de enzimas específicas, as inulinases (β – frutofuranosidades) de origem microbiana ou vegetal (leveduras, bactérias e fungos), libertando moléculas de frutose ou fruto-oligosacáridos.

A capacidade de hidrolisar a inulina foi atribuída exclusivamente à enzima β – frutofuranosidase, e para além da inulina outros glúcidos são também hidrolisados, como a sacarose (Januário, 1999).

Os FOS podem ser produzidos de duas formas: a partir de inulina obtida das raízes de chicória, sendo parcialmente hidrolisada e purificada, por acção duma enzima – endoinulinase (Roberfroid, 2007), ou pela síntese enzimática através da molécula sacarose, pela acção da β – frutofuranosidade (Cummings, 1997; Izydorczyk, 2005).

A inulina nativa não purificada contém sempre glucose e frutose livres, bem como sacarose, ou seja, contém todos os constituintes glucídicos extraídos das raízes.

A solubilidade da inulina em água depende do grau de polimerização médio (GPm) e da temperatura a que o solvente se encontra (normalmente água). Se a água se encontrar a 10°C a sua solubilidade é cerca de 6%, enquanto a 90°C é de 35% (Toleni *et al.*, 2008). King *et al.*, (2001) relatou que a 25 °C a inulina é muito pouco solúvel em água (10%), mas se aumentar a temperatura a sua solubilidade aumenta significativamente (Toneli *et al.*, 2008; Franck, 2006). Devido às suas características higroscópicas apresenta tendência para aglomerar (Silva, 1996).

Apenas as moléculas mais pequenas ($GP \leq 7$) são solúveis em presença de etanol a 80% (v/v), tornando-se assim mais fácil precipitar as moléculas de maior GP (Suzuki, 1993).

Geralmente a inulina e os FOS apresentam-se sob a forma de um pó branco, de fácil manuseamento, transporte e armazenamento. A cor pode variar entre o branco e o cinza, quanto menor for o grau de purificação. O pó de inulina é inodoro e tem um sabor praticamente neutro (nas moléculas de maior GP) (Simão, 2005). A inulina ($GP > 10$) pode ainda ser utilizada como fonte de frutose (Januário, 1999; [3]; [2]).

1.2. Propriedades tecnológicas

A inulina e a oligofrutose têm sido muito utilizadas pela indústria alimentar em toda a Europa e nos Estados Unidos, devido às suas diversas propriedades tecnológicas e nutricionais, podendo funcionar como substituto de açúcar, substituto de gorduras, intensificador de sabor e melhorador de textura [2].

As propriedades tecnológicas da inulina variam consoante o grau de polimerização (GP). Moléculas pequenas entre 3 e 6 unidades de frutose são utilizados como edulcorantes de baixo valor calórico, enquanto moléculas com maior GP podem ser utilizados como substitutos de gordura e agentes de gelificação (Simão, 2005; Toledo, 2008). A oligofrutose (GP<10) tem um poder edulcorante (PE) moderado (1/3 do PE da sacarose) e um baixo valor calórico, por isso pode ser considerado um substituto natural do açúcar, não tanto pelo poder edulcorante que possui mas porque em combinação com outros edulcorantes sintéticos, funciona como intensificador de sabor em determinados produtos alimentares.

A única forma pela qual a inulina pode fornecer aporte calórico ao organismo, é através da absorção dos produtos resultantes da sua fermentação no cólon pela flora microbiana, tais como ácidos gordos de cadeia curta (SCFA) e ácido láctico. Estes fornecem ao organismo uma quantidade moderada de energia de aproximadamente 1-1,5 kcal/g de inulina. Assim a quantidade calórica fornecida pela inulina é muito menor do que a fornecida por outros glúcidos, que são digeridos e absorvidos no intestino delgado.

A fracção da inulina de cadeias mais longas é menos solúvel em água fria, ou à temperatura ambiente (Lattanzio *et al.*, 2009). Devido à fraca solubilidade a temperaturas baixas, quando soluções concentradas em inulina são refrigeradas ou congeladas, estas evoluem para um processo de separação de fases. Enquanto a fase precipitada se torna cada vez mais pastosa e concentrada, a outra permanece diluída, podendo ainda existir algumas partículas em suspensão (Toneli, 2008).

As propriedades reológicas da inulina fazem desta um eficiente substituto de gordura em muitos alimentos. Em presença de água funciona como estabilizante de espumas e emulsões, e como agente gelificante ou espessante em determinadas aplicações alimentares. Em consequência, forma uma estrutura cremosa proporcionando uma textura semelhante à causada pela gordura (Januário, 1999; Simão, 2004; [3]; [2]).

1.3. Propriedades funcionais

A inulina e os FOS têm despertado bastante interesse em termos nutricionais/funcionais devido às propriedades que possuem, principalmente pelas típicas propriedades de fibra alimentar, e deste modo são consideradas como tal.

1.3.1. Efeitos no sistema gastrointestinal – Conceito de fibra alimentar

Por definição, as fibras alimentares ou dietéticas são constituintes estruturais das partes edíveis de plantas ou glúcidos resistentes à digestão, e à absorção no intestino delgado humano, sendo as fibras solúveis posteriormente fermentadas parcial ou completamente no intestino grosso (AACC). De acordo com Cummings *et al.*, (1992) a fibra alimentar inclui:

- Polissacáridos estruturais: celulose, hemicelulose, pectinas, gomas, mucilagens, etc;
- Polissacáridos não-estruturais: inulina, fruto-, galacto- ou malto-oligossacáridos, dextrinas, maltodextrinas resistentes, metil-celulose, hidroxilpropil metil-celulose e amido resistente;
- Lenhina, e outras substâncias como as ceras, cutina, ácido fitico e suberina.

A classificação de fibra alimentar quanto à sua solubilidade é importante, pois as fibras solúveis e insolúveis têm efeitos fisiológicos diferentes no organismo. As insolúveis tais como a celulose e algumas hemiceluloses, estão associadas ao aumento do bolo alimentar (efeito de volume no tracto gastrointestinal) e melhoram o efeito laxativo. As fibras solúveis actuam ao nível do intestino grosso (ou cólon) (Bollinger, 1999; [9]).

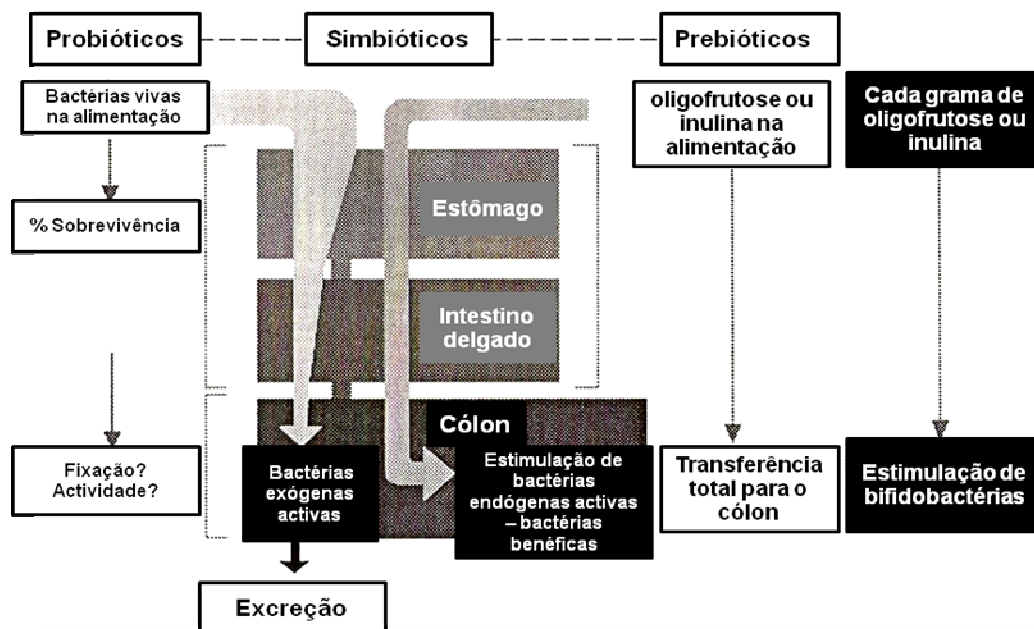
Estudos realizados indicam que a fibra alimentar pode diminuir o apetite, estimular os movimentos peristálticos, aumentar a excreção de ácidos biliares e o teor da humidade nas fezes, reduzir o nível de glucose no sangue, regular a actividade da flora microbiana e actuar como um absorvente de metais pesados (Górecka *et al.*, 2000)

A fibra alimentar provoca o aumento da viscosidade do conteúdo do estômago, e retarda o esvaziamento gástrico (Leclerc *et al.*, 1984). Estes efeitos actuam ao nível da digestão e da ingestão de nutrientes, ocorrendo uma sensação de saciedade. Por conseguinte, estes aspectos tornam as fibras alimentares essenciais ao consumo humano. Contudo, em muitas sociedades o consumo diário de um adulto é cerca de 15 a 20 gramas, embora a recomendação diária seja de pelo menos 25 gramas (Van Loo, 1995; [2]).

A fibra solúvel ao passar pelo intestino grosso é automaticamente fermentada pela microflora intestinal, que a utiliza como substrato. Da fermentação decorre a produção de ácidos gordos de cadeia curta (nomeadamente ácido acético, ácido propiónico e ácido butírico), ácido láctico, H₂ e CO₂. Estes compostos estimulam o crescimento de bifidobactérias e de bactérias lácticas probióticas, e simultaneamente suprimem o crescimento de bactérias patogénicas, tais como *Escherichia coli* ou *Clostridium perfringens*.

Por esta razão estes compostos são definidos como prebióticos, e como tal ingredientes funcionais. A definição original foi lançada em 1995 pela FAO e define prebióticos como “ingredientes alimentares não digeríveis que afectam de forma benéfica o hospedeiro, pois estimulam selectivamente o crescimento e/ou actividade de um número limitado de bactérias presentes no cólon, e por conseguinte melhoram a saúde do hospedeiro” [5]. Uma definição mais recente considera que “um prebiótico é um ingrediente selectivamente fermentado que permite mudanças específicas tanto na composição como na actividade da microflora gastrointestinal, proporcionando efeitos benéficos à saúde do hospedeiro”. A principal acção dos prebióticos é estimular o crescimento e/ou activação do metabolismo de muitos grupos de bactérias benéficas, actuando assim sobre os probióticos.

Os probióticos são microrganismos vivos que quando presentes em quantidades adequadas, proporcionam efeitos benéficos ao equilíbrio e às funções fisiológicas da microflora intestinal (Fuller, 1992). A combinação entre probióticos e prebióticos resulta num efeito sinérgico. A Figura 2 ilustra o comportamento isolado de probióticos e prebióticos no organismo humano, assim como o efeito simbiótico. Verifica-se que a simbiose entre os dois apresenta um aumento dos efeitos benéficos ao nível do tracto gastrointestinal.



Adaptado de: Orafiti, 1996

Figura 2 – Efeito simbiótico entre probióticos e prebióticos.

Um produto alimentar que contenha prebióticos e probióticos é denominado simbiótico. A interação entre estes compostos *in vivo*, pode ser favorecida pela adaptação do probiótico ao substrato, antes do seu consumo. Em alguns casos pode resultar numa vantagem competitiva para o probiótico, se este for consumido juntamente com o prebiótico. Assim, durante a passagem pelo tracto gastrointestinal superior o número de probióticos não é rapidamente reduzido, como se fosse ingerido isoladamente, devido à presença do seu substrato específico (Orafti, 1996).

Entre os oligossacáridos naturais não digeríveis que preenchem o critério de fibra alimentar, os FOS são os únicos produtos reconhecidos e utilizados como ingredientes alimentares prebióticos (Gibson *et al.*, 1994).

Devido às suas propriedades fermentativas específicas, as frutanas do tipo inulina têm características diferentes de outras fibras alimentares. Isto é, podem contribuir de modo significativo para uma dieta equilibrada através do aumento do conteúdo em fibra, pela melhoria da diversidade de fontes de fibra, e ainda pela afectação significativa de muitas das funções gastrointestinais (composição da microflora intestinal, funções da mucosa, actividades endócrinas, absorção mineral, etc.), e mesmo em funções sistémicas, especialmente homeostase lipídica e funções imunológicas, bem como na redução do risco de diversas doenças (Roberfroid, 2007). Os efeitos benéficos provocados por estes compostos estão sumarizados no anexo 1.1.

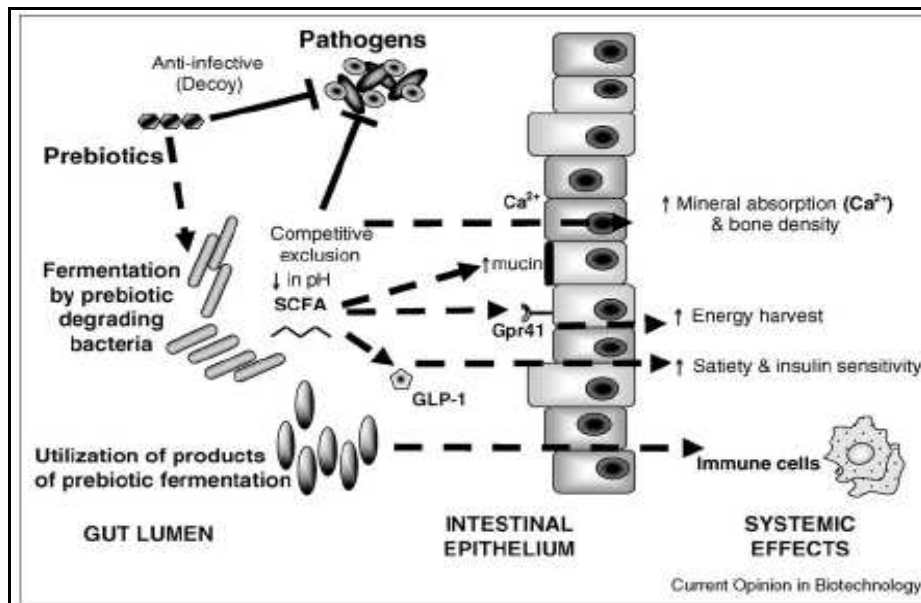
Segundo Gibson *et al.*, (1994), para um alimento ou ingrediente alimentar ser classificado como prebiótico tem de seguir alguns critérios, nomeadamente:

- Ser resistente à acidez gástrica, à hidrólise enzimática e à absorção gastrointestinal;
- Não pode ser hidrolisado nem absorvido na parte superior do tracto gastrointestinal;
- Deve ser selectivamente fermentado por um número limitado de bactérias, potencialmente benéficas ao cólon;
- Deve ser capaz de alterar a composição da flora microbiana, a favor de colónias benéficas;
- Deve preferencialmente induzir efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro.

A flora microbiana existente no intestino é uma mistura complexa de milhares de bactérias. As células metabolicamente activas constituem cerca de metade da massa do conteúdo do intestino grosso, razão suficiente para considerar que a flora microbiana é um factor importante que influencia o metabolismo e a saúde humana (Orafti, 1996).

A ingestão de 5 a 8g por dia de inulina deveria ser suficiente para induzir efeitos positivos na flora microbiana. Mas existe a possibilidade de ocorrer efeitos secundários indesejados, designadamente desconforto intestinal, provocado pela produção de gases. Não obstante, as bifidobactérias e os lactobacilos não conseguem produzir gás como parte do seu processo metabólico. Assim, a ingestão de uma dose razoável de 20g por dia ou mais não deveria provocar gases. Mas se eventualmente sucederem, então o prebiótico em questão não está a actuar com autenticidade (Gibson *et al.* 2007). Estudos realizados indicam que estes compostos (inulina e FOS) são bem tolerados até uma quantidade de 20g/dia, no entanto se a ingestão for superior a 30g/dia ou mais pode ocorrer diarreia (Den Hond *et al.*, 2000).

Tal como outros glúcidos simples, nomeadamente glucose, frutose e sacarose, a oligofrutose e a inulina induzem o decréscimo do pH médio da flora microbiana, durante a fermentação anaeróbica. Através da estimulação da microflora favorável no intestino, o consumo de prebióticos resulta em concentrações mais elevadas de ácidos gordos de cadeia curta. Através da alteração da composição e funcionalidade da flora microbiana, os prebióticos actuam não só na exclusão competitiva de potenciais patogénicos, mas também na modulação do sistema imunitário e no aumento das defensas do intestino (Lomax, 2008). A Figura 3 ilustra os benefícios dos prebióticos no tracto gastrointestinal dos mamíferos, e seus efeitos sistémicos.



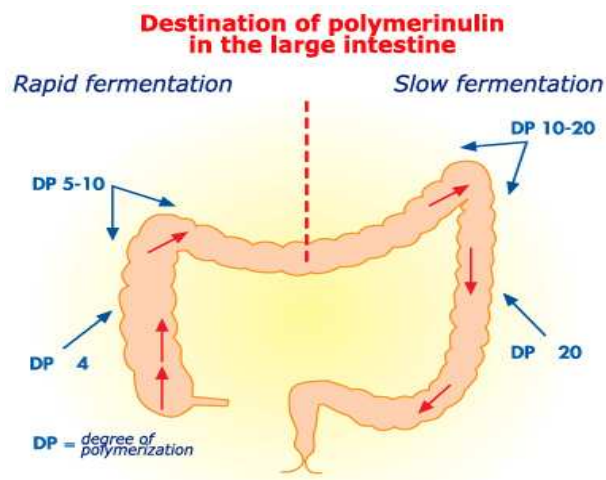
Fonte: Saulnier *et al.*, 2009

Figura 3 – Descrição dos diversos benefícios dos prebióticos, no tracto gastrointestinal de mamíferos e os seus efeitos sistémicos. GLP-1: “glucagon-like peptide-1” (gene humano que reside no cromossoma 6); Gpr41: “G-protein coupled receptor 41”.

Pela observação da Figura 3 verifica-se que os produtos resultantes da fermentação de prebióticos (os SCFA) desencadeiam uma série de mecanismos com efeitos benéficos, nomeadamente ao nível do sistema imunitário. Em especial o ácido butírico ou butirato, tem atraído bastante interesse pois inibe *in vitro* o crescimento de células cancerígenas do cancro do cólon (Poll-Zober, 2007).

Gibson e Wang em 1993 demonstraram que ao comparar outros glúcidos (simples ou complexos) com os FOS, estes são selectivamente fermentados pelas bifidobactérias. Hidaka *et al.*, em 1986 referem que a administração de 8 g/dia de oligofrutose durante duas semanas a 23 indivíduos, melhorou a flora intestinal com subsequente alívio da obstipação, aumentou do número de colónias de bifidobactérias, aumentou o colesterol HDL, e suprimiu a produção de substâncias intestinais putrefactas (Orafi, 1996).

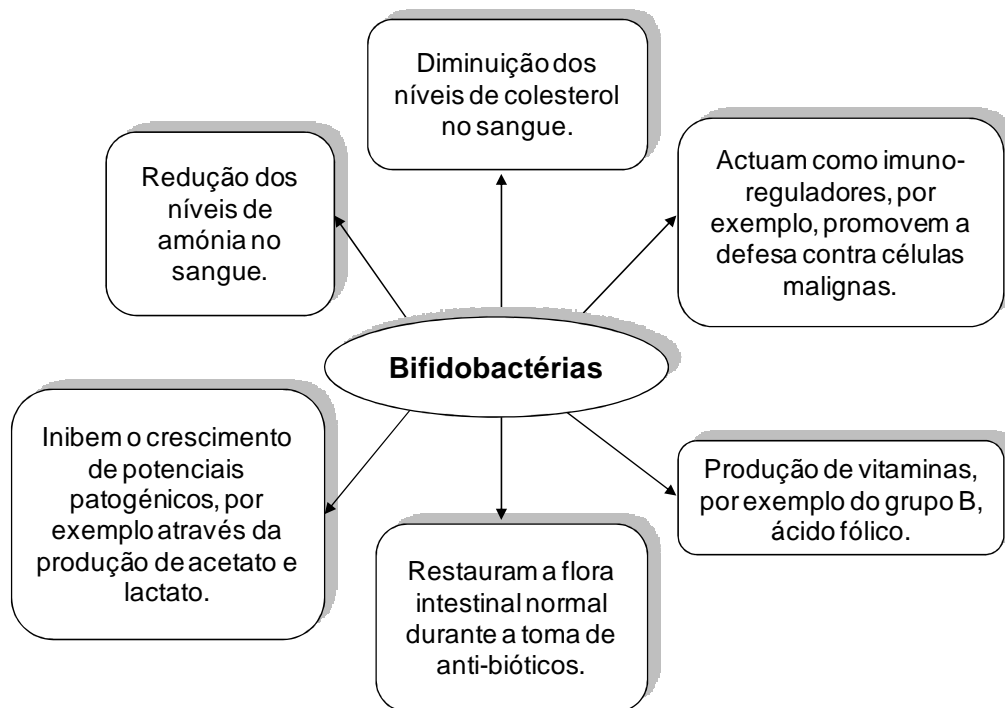
O grau de polimerização da inulina determina o modo como actua no cólon. Sabe-se que a maioria dos prebióticos são relativamente pequenos ($\text{GP} < 10$), com excepção da inulina. Portanto, quanto maior for a cadeia de FOS mais lenta é a fermentação, e consequentemente maior será o efeito prebiótico. Moléculas mais pequenas são rapidamente fermentadas no início do intestino grosso, enquanto moléculas maiores são mais lentamente fermentadas e a uma distância mais longa (Figura 4). No entanto, ambas as moléculas promovem a actividade dos probióticos no cólon (Gibson, 2004; [8]).



Fonte: [10]

Figura 4 – Esquematização dos diferentes locais do cólon onde inulina/FOS são fermentados

As bifidobactérias são o maior grupo de bactérias sacarolíticas presentes no cólon, e constituem 25% da população total do intestino de um adulto e 95% de um recém-nascido (Kawaze *et al.* 1981). São vários os estudos que comprovam os benefícios do consumo diário de prebióticos, e a sua contribuição para o aumento do metabolismo das bifidobactérias (ver anexo 1.2). Na Figura 5 estão representados os principais benefícios das bifidobactérias.



Adaptado de: Kaur & Gupta, 2002

Figura 5 – Efeitos benéficos na saúde provocados pelas bifidobactérias.

Devido à multiplicação destas e à diminuição do pH do cólon, o ambiente intestinal torna-se inabitável para bactérias potencialmente patogénicas, tais como *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Veillonella* e *Klebsiella*, sendo simultaneamente reduzidas (Gibson, 1994)

Um dos principais objectivos na investigação de alimentos funcionais é identificar componentes que possuam capacidade de modular positivamente as funções de defesa do organismo, ajudando a melhorar, a reforçar e a equilibrar individualmente cada uma destas. Existem alguns dados que comprovam que as frutanas do tipo inulina são potenciais ingredientes alimentares funcionais, capazes de actuar neste campo. Os prebióticos afectam, assim, beneficemente o sistema imunitário (Roberfroid, 2007).

Actualmente, os prebióticos são utilizados como ingredientes alimentares em diversos produtos alimentares funcionais (Izydorczyk, 2005). Nos EUA, estes ingredientes fazem parte da lista GRAS (Orafti, 1996). A sua incorporação em alimentos e bebidas ajuda a aumentar a ingestão diária de fibras, ao mesmo tempo que estimula o sistema digestivo. Mundialmente, a inulina e oligofrutose são os prebióticos mais estudados e bem estabelecidos.

Para além dos benefícios ao nível do sistema digestivo destacam-se outras propriedades nutricionais, tais como controlo do peso corporal, melhoria da absorção de certos minerais, redução de doenças crónicas nomeadamente cardíacas e efeitos benéficos no metabolismo lipídico.

1.3.2. Controlo do peso corporal e efeitos no metabolismo glucídico

Como referido anteriormente a inulina e os FOS não são digeridos pelo nosso aparelho digestivo, mas em contra partida são fermentados por bactérias no intestino grosso. Deste modo, não contém valor calórico nem impacto nos níveis de glucose no sangue. O valor calórico da inulina varia entre 1,5 a 2 kcal/g e é baseado no metabolismo dos produtos de fermentação, que são absorvidos no cólon (Roberfroid, 1999). Estima-se que o valor calórico dos substratos fermentados seja entre 1 e 3 kcal/g (Bernier & Pascal, 1990). No Quadro 1 comparam-se os valores calóricos da sacarose, inulina e oligofrutose (FOS).

Quadro 1 – Valores calóricos de alguns glúcidos referidos à matéria seca.

Produto	kJ/g	Valor energético (kcal/g)	Comparação com a sacarose (%)
Sacarose	17	4	100
Inulina	4,2	1	25
Oligofrutose	6,3	1,5	40

Fonte: Orafiti, 1996.

Normalmente após uma refeição, os glúcidos ingeridos são totalmente convertidos em glucose, a qual é parcialmente armazenada sob a forma de glicogénio nos músculos, para ser posteriormente utilizada pelo organismo para produzir energia. Quando o armazenamento de glicogénio atinge o máximo o excesso de glúcidos é convertido em gordura. Estudos indicam que a inulina regula temporariamente este processo, resultando numa redução significativa nos níveis de triglicéridos, fosfolípidos e colesterol do plasma, primeiramente no colesterol LDL, não afectando a fracção benéfica de colesterol, HDL (Roberfroid, 2007).

A inulina e os FOS regularizam o índice glicémico, conduzindo a uma diminuição dos picos de glicemia e insulina, ajudando a controlar e a manter o peso. Os diabéticos também beneficiam da estabilidade dos níveis de açúcar, o que faz da inulina um excelente ingrediente a incorporar em produtos para diabéticos. O potencial de utilização de inulina para este tipo de alimentos é conhecido desde o início do século 20 (Orafti, 1996).

Sanno *et al.*, (1984) ao estudarem os efeitos da ingestão diária de FOS em pacientes diabéticos, não detectaram alterações nos níveis de açúcar no sangue, nem a estimulação da produção de insulina, nem mesmo alterações significativas na concentração de gordura no sangue.

1.3.3. Efeitos no balanço mineral e vitamínico

Vários constituintes alimentares têm despertado imensa atenção como potenciais melhoradores da absorção mineral, tais como a lactose, caseína, fosfopéptidos, e oligossacáridos não digeríveis, especialmente as frutanas do tipo inulina (Cashman *et al.*, 2002).

O cálcio é um mineral chave para o corpo humano, presente maioritariamente nos ossos e cerca de 1% nos dentes. A capacidade do organismo absorver cálcio diminui com a idade, sendo assim vital ingerir quantidades suficientes deste mineral. A fermentação da inulina no intestino grosso resulta num aumento de ácidos gordos de cadeia curta, reduzindo o pH do intestino tornando o cálcio mais solúvel. Assim aumenta a sua disponibilidade, sendo rapidamente absorvido pelo sangue. Este efeito pode contribuir para reforçar o tecido ósseo.

Várias experiências com animais (maioria ratos) demonstraram que o uso de frutanas do tipo inulina aumenta significativamente a absorção de minerais, sobretudo de cálcio e magnésio (Roberfroid, 2007).

Recentes avanços nesta área de investigação demonstraram em humanos que as frutanas do tipo inulina aumentam primariamente a absorção de cálcio por via da mucosa do cólon (Abrams *et al.*, 2007).

1.3.4. Efeitos no metabolismo lipídico

Os níveis de gordura no sangue (colesterol e triglicéridos) são importantes pois estão relacionados com o risco de doenças cardiovasculares, ou seja, quanto maiores os níveis de gordura no sangue maior é o risco de contrair doenças coronárias.

A modulação da digestão/absorção ou do metabolismo lipídico é outro efeito fisiológico das frutanas do tipo inulina, que afecta a trigliceridemia¹ e a colesterolemia², assim como a distribuição da quantidade de lípidos e das diferentes lipo-proteínas, a favor de efeitos mais benéficos para a saúde (Delzenne *et al.*, 2002)

Experiências realizadas em ratos comprovaram que a ingestão de inulina e oligofrutose, reduzem os níveis de triglicéridos no sangue. O consumo de inulina não altera os níveis de colesterol total no sangue, mas melhora significativamente a relação HDL/LDL (Orafti, 1996). Deste modo pode reduzir o risco de doenças cardíacas. Este efeito é provavelmente mediado pelos produtos obtidos a partir da fermentação no cólon (ácidos gordos de cadeia curta e ácido láctico). Como estes são absorvidos pelo intestino, são conhecidos como reguladores chave no metabolismo do sistema hepático.

O consumo de prebióticos pode provocar um aumento da produção e excreção fecal de sais biliares, conduzindo à redução dos níveis de colesterol (Gibson, 1994).

1.4. Aplicações Alimentares

Conforme atrás referido a inulina e os FOS apresentam diversas propriedades tecnológicas e nutricionais, que os caracterizam nomeadamente como óptimos substitutos de açúcar e gordura em produtos alimentares, em diversas aplicações nesta área. São pois uma excelente opção de ingredientes alimentares funcionais, atendendo ao desenvolvimento de diversas doenças associadas ao estilo de vida actual da população em geral, e à necessidade em apostar em alternativas mais saudáveis.

¹ Concentração de triglicéridos no sangue

² Concentração de colesterol no sangue

São vários os produtos alimentares a que se pode adicionar estes ingredientes, entre os quais iogurtes e seus derivados, substitutos de refeição (por exemplo: batidos), sumos e polpas de fruta, produtos de pastelaria, cereais de pequeno-almoço, chocolates, gelados, molhos, produtos de padaria (pão, massas, farinhas, etc.), preparados de carne, refeições prontas a comer, e ainda a suplementos alimentares.

A textura dos alimentos é actualmente um factor muito importante na aceitabilidade e satisfação dos consumidores, designadamente em determinados produtos lácteos (iogurtes, bebidas fermentadas à base de leite e sobremesas lácteas). Assim, a inulina ao ser incorporada nestes alimentos pode melhorar as suas características de textura, tornando-os mais cremosos e simultaneamente com menores teores calóricos [2].

As moléculas de inulina com maior GP apesar de serem pouco solúveis em água fria, podem ser uma excelente fonte de fibras quando adicionadas a águas minerais, reforçando assim o consumo de fibras. O principal objectivo da incorporação de inulina/FOS em alimentos com baixos teores de gordura (sumos “light”, bolachas dietéticas, chocolates, gelados, etc.), é melhorar a textura e a sensação causada na cavidade bucal, substituindo assim a gordura nestas propriedades ([2]; [3]).

Scott Noar, gerente de aplicações da revista *Food Technology* refere a inulina/FOS como um excelente ingrediente a ser adicionado a chocolates de baixo valor calórico. Geralmente são adicionados poliólcoois a este tipo de chocolates, cujo objectivo é a substituição do açúcar por estes ingredientes. Mas acontece que estes alteram o sabor natural do chocolate, deixando um sabor residual. Se a inulina for adicionada em simultâneo com os poliólcoois, esse efeito é reduzido e torna o produto mais semelhante ao chocolate habitual. Por outro lado, se forem utilizados edulcorantes de síntese juntamente com a inulina ocorre um efeito sinérgico, e o sabor final é mais próximo do chocolate habitual, contribuindo também para a redução dos custos relativos aos edulcorantes utilizados (Pszczola, 2002).

Os diferentes graus de polimerização (comprimento de cadeia) de inulina e FOS são responsáveis pelas diferenças a nível tecnológico. As propriedades nutricionais são semelhantes para ambos, logo a decisão de escolha para aplicação alimentar deverá ser em função dos atributos tecnológicos pretendidas para o produto final (Simão, 2004).

A incorporação de inulina em preparações alimentares contribui simultaneamente para alargar o tempo de prateleira devido à sua capacidade de aprisionar água, diminuindo a sua actividade de água. Como referido anteriormente, pode ser utilizada praticamente em todas as aplicações alimentares, excepto em produtos líquidos muito ácidos com vida de prateleira longa à temperatura ambiente, entre os quais os refrigerantes [6].

O Quadro 2 mostra as principais propriedades tecnológicas e nutricionais destes ingredientes, quando incorporados em certos produtos alimentares, nomeadamente produtos lácteos e seus derivados.

Quadro 2 – Propriedades tecnológicas e nutricionais resultantes da adição de inulina/oligofrutose em determinados produtos alimentares.

Propriedades Tecnológicas e Nutricionais	Iogurtes	Leite	Queijo Fresco	Sobre mesas lácteas	Bebidas de soja	Preparados de fruta
Substituto de gordura	x		x	x		
Substituto de açúcar	x			x		x
Alteração da textura	x	x	x	x		x
Aumento do aroma a frutos	x					x
Sinergia com edulcorantes de intensidade elevada						x
Enriquecimento de fibra	x	x	x	x	x	x
Benefícios prebióticos	x	x	x	x	x	x
Produto simbiótico	x					
Melhoramento da absorção de cálcio	x	x	x			x

Adaptado de: [2].

No Quadro 3 está indicado para a Europa e EUA o consumo de inulina e oligofrutose através dos alimentos que os contém naturalmente.

Quadro 3 – Consumo alimentar de inulina e oligofrutose.

	Consumo diário (g) per capita
Europa	3-11
Bélgica/Luxemburgo	3-10
Espanha	6-17
EUA	1-4

Adaptado de: Van Loo *et al.*, 1995; Roberfroid, 2000.

Nos USA estima-se que o consumo de inulina e FOS provenientes de chicória seja entre 1 a 4 g/dia, com 90% do consumo entre 2 a 8g/dia (MushFegh *et al.*, 2000). Na Europa a ingestão média de inulina e FOS naturalmente presentes nos alimentos, estima-se que seja entre 3 e 11g/dia (Van Loo, 1995).

1.5. Fontes de inulina e FOS

Depois do amido, as frutanas são os polissacáridos não-estruturais mais abundantes encontrados na natureza, e estão presentes numa vasta gama de plantas assim como em algumas bactérias (Frank, 2006). Estes constituintes encontram-se em muitas espécies de plantas comestíveis, nomeadamente na cebola, alho, banana, tupinambo, chicória, espargos, trigo e centeio (Izydorczyk, 2005).

O Quadro 4 mostra os teores de inulina e FOS em percentagem de matéria fresca de algumas fontes comestíveis ricas nestes compostos.

Quadro 4 – Teores médios de inulina e FOS (% de matéria fresca) de algumas plantas habitualmente consumidas.

Fonte	Parte comestível	Conteúdo em Inulina	Conteúdo em FOS
Cebola (<i>Allium cepa</i> L.)	Bolbo	2-6	2-6
Tupinambo (<i>Helianthus tuberosus</i> L.)	Tubérculo	16-20	16-20
Chicória (<i>Cichorium intybus</i> L.)	Raiz	15-20	5-10
Alho (<i>Allium sativum</i> L.)	Bolbo	9-16	3-6*
Espargos (<i>Asparagus officinalis</i> L.)	Raiz	1-30	1-20*
Alho-porro (<i>Allium ampeloprasum</i> L.)	Bolbo	3-10	2-5*
Banana (<i>Musa</i> sp.)	Fruto	0,3-0,7	0,3-0,7
Trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Semente	1-4	1-4
Dente-de-leão (<i>Taraxacum officinale</i>)	Folhas	12-15	-
Yacon	Raiz	3-19	3-19

Fonte: Orafti, 1996. * Valor estimado

Quadro 5 – Ocorrência e distribuição de fruto-oligossacáridos em plantas comestíveis

Fonte	% inulina	Distribuição de FOS (%)			
		GF ₂	GF ₃	GF ₄	GF ₅₋₈
Cebola	2-6	61	25	10	3
Chicória	15-20	4	5	5	16
Trigo	1-4	30	13	6	50
Tupinambo	16-20	GP<9: 50			
Alho	9-16	GP<9: 10-20			

Fonte: Cui, 2005.

O Quadro 5 ilustra a ocorrência e distribuição de FOS em fontes comestíveis. É nos órgãos subterrâneos da chicória, do tupinambo e da dália (*Dahlia sp.*) onde se encontram os maiores teores de inulina. O tupinambo é o que apresenta maior percentagem (16-20%), mas o seu metabolismo é muito sensível ao frio, e apenas 20% das cadeias apresenta um GP superior a 10 (Franck, 2006). A inulina com um GP superior a 9 está presente maioritariamente na chicória, contrariamente ao que acontece nas outras fontes de inulina (tupinambo, cebola ou alho).

No Quadro 6 estão indicados o rendimento e o conteúdo em inulina das três principais fontes de inulina. Pelo quadro verifica-se que a chicória é a planta mais utilizada na produção industrial de inulina, devido ao seu elevado rendimento (5-11 t/ha).

Quadro 6 – Rendimento (t/ha) e conteúdo (%) em inulina na dália, tupinambo e chicória

	Dália	Tupinambo	Chicória
Raízes e tubérculos (t/ha)	25	35-60	25-75
Materia seca (%)	15-22	19-25	20-25
Inulina (%)	10-22	14-18	15-18
Inulina (t/ha)	2,5-3,0	4,5-8,5	5-11
GP médio	13-20	6-10	10-14

Fonte: Franck, 2006

O consumo de alimentos ricos em inulina/FOS pode não ser suficiente para se atingir as quantidades desejadas destes constituintes no organismo. Assim, a investigação e o desenvolvimento de novos produtos com características funcionais, tem como principal objectivo isolar estes constituintes das suas fontes para adiciona-los a produtos alimentares vulgarmente consumidos (Gibson *et al.*, 2007).

Actualmente já são muitas as empresas que comercializam inulina e oligofrutose, em várias formas (Quadro 7). As principais empresas que produzem inulina na forma comercial são a Orafti (empresa belga), Cosucra (empresa belga) e a Sensus (empresa holandesa).

Quadro 7 – Algumas formulações de inulina comercial no mercado actual.

Empresa	Nome comercial	Tipo de Formulações	Origem
Cosucra	Fibrulose®	F97	Oligofrutose de chicória
	Fibruline®	Instantânea, inulina solúvel (S20), XL, DS2	Inulina de chicória
Sensus	Frutalose	L85 - Elevado PE	Oligofrutose de chicória
	Frutafit	L92 - Elevado teor de fibra	Inulina de chicória
		Inulina nativa de elevada dispersibilidade (HD), de elevada solubilidade (CLR), com excelentes propriedades texturizantes (TEX)	
Beneo Orafti	Orafti®	Oligofrutose líquida de 60, 85 e 95% de conteúdo (L60, 85, 95), oligofrutose em pó (P95), e synergy (oligofrutose e inulina)	Oligofrutose de chicória
	Orafti®	Inulina standard em gel (ST), granulada (GR), elevada acção a baixas e a elevadas temperaturas (HP e HPX), de elevada solubilidade (HSI).	Inulina de chicória
NWB Laboratories	Inulation®™	Várias formulações (em pó, cápsulas, etc)	100% inulina de chicória

Adaptado de: [2], [3], [4] e [11].

2. Chicória como principal fonte de inulina

A Chicória (*Cichorium intybus* L.) é uma planta conhecida desde a antiguidade devido às suas propriedades terapêuticas. É umas das matérias-primas mais conhecidas e utilizadas na produção de substitutos de café, bem como para extracção de inulina devido ao elevado conteúdo presente e facilidade de extracção (maior rendimento).

De acordo com Hedrick (1979) esta planta tem vindo a ser utilizada e cultivada desde os tempos imemoráveis, embora não existam provas suficientes que o comprovem (Ryder, 1979).

No início do século XIX, durante a época napoleónica, as raízes de chicória foram utilizadas como substitutos de café. Eram cortadas, torradas e moídas, e o pó resultante era posteriormente consumido como sucedâneo de café (Frankinet, 1996).

A chicória teve provavelmente origem na região do Mediterrâneo (Boswell, 1949). Esta foi mencionada pela primeira vez em 1616 na Alemanha, e cultivada em Inglaterra por volta de 1686, e França em 1826. Mais tarde foi introduzida como planta ornamental na América do Norte, propagou-se e tornou-se uma “infestante” em várias zonas temperadas.

Haber *et al.* (1941), Meijer e Mathijssen (1992) e Meijer *et al.* (1993) concluíram que das três principais espécies que contêm maiores teores em inulina (chicória, tupinambo e dália), é a chicória a mais promissora fonte de inulina/frutose, isto porque apresenta vantagens agronómicas, podendo ser cultivada de forma semelhante à beterraba sacarina (Januário, 1999).

As raízes de chicória continuam a ser utilizadas em muitos países para a produção de sucedâneos de café, e contêm mais de 70% de inulina (em matéria seca). Um copo de sucedâneo de café contém cerca de 3 g de inulina (Van Loo *et al.*, 1979).

As raízes frescas de chicória pertencem à espécie *intybus*, bem com as suas cultivares e contêm quantidades consideráveis de água. Tal como outros grupos de plantas pertencentes à família *Compositae*, as raízes de chicória contêm como principal composto ou substância de reserva a inulina. Para além deste constituinte, contêm outros tipos de glúcidos, proteína, fibra e outras substâncias. O Quadro 8 mostra a composição das raízes de chicória, na forma fresca e seca.

Quadro 8 – Composição das raízes de chicória fresca e seca.

Componente	Raiz fresca (g/100g)	Raiz seca (g/100g)
Teor em água	71,6 - 78,8	7,5 - 17,0
Glúcidos	17,9 - 22,8	61,0 - 78,5
Fibra bruta	1,0 - 1,1	1,1 - 5,2
Matéria azotada	1,0 - 1,1	4,5 - 6,6
Cinza	0,5 - 0,9	1,1 - 4,4
Lípidos	0,1 - 0,2	0,3 - 1,7

Fonte: Adaptado de Maier, 1987.

2.1. Classificação botânica e morfológica

A Chicória é uma planta herbácea, pertence à família das Compostas – *Asteraceae* (*Compositae*), à sub-família *Cichoriae* e ao género *Cichorium*. A sub-família a que pertence inclui outras plantas nomeadamente a alface, salsa, entre outras. Dentro do género existem duas espécies de grande interesse: *C. intybus* L. e *C. endivia* L.

A *C. intybus* L. cresce espontaneamente em toda a Europa e no Médio Oriente, e subespontaneamente na América do Sul e do Norte, na África do Sul, Austrália e Índia.

Dentro da *C. intybus* L. consideram-se três principais variedades, com características distintas (Januário, 1999):

- 1) *Cichorium intybus* L., var. *foliosium* Hegi – é conhecida por endívia, embora esta designação não seja a mais adequada. Após crescimento forçado sob condições particulares de temperatura, humidade e luminosidade, apresenta-se com um botão foliar de cor creme amarelada e é normalmente consumida como legume ou em salada.
- 2) *C. intybus* L., var. *intybus* – é a chicória selvagem melhorada (ou “barba de capuchinho”), cujas folhas são também consumidas, mas sobretudo para a alimentação animal.
- 3) *C. intybus* L., var. *sativum* - variedade mais importante, assim como as suas cultivares. As suas raízes são utilizadas industrialmente para a produção de chicória para “café”, tradicionalmente assim conhecida ou ainda por chicória industrial. Noutra vertente de utilização industrial, dela se pode extrair inulina comercial.

As plantas pertencentes à família das Compostas caracterizam-se por terem elevados teores em inulina nas suas raízes. Esta é uma característica do género *Cichorium*, embora partilhada juntamente pelo tupinambo, dália, dente-de-leão, entre outras.

A espécie *C.intybus* L. geralmente cresce de forma espontânea perto das margens dos rios e dos caminhos. Tem sido utilizada desde a antiguidade para consumo humano e animal, e ainda pelos seus atributos medicinais.

Relativamente à *C. endívia* L. é vulgarmente denominada “chicória escarola” e as suas folhas são consumidas como salada (Dhellemmes, 1987).

Ao nível morfológico existem diferenças entre a chicória “selvagem” e a cultivada industrialmente, como se pode observar na Figura 6. Na chicória selvagem as flores de são de cor azul e sobressaem, enquanto que a chicória industrial é colhida numa fase em que apresenta um caule floral em estado de desenvolvimento ainda muito reduzido, não chegando a florir.



(A)

(B)

Figura 6 – *Cichorium intybus* L.: (A) Chicória “selvagem”, (B) Chicória industrial.

A raiz da chicória selvagem apresenta um sistema radicular aprumado, profundante e com raiz principal delgada. A chicória industrial ostenta uma raiz fusiforme com cerca de 25 a 30 cm de comprimento, de cor branca, e contém um suco leitoso, amargo e tónico.

A chicória industrial tem um ciclo vegetativo de dois anos (bienal), contudo é colhida no primeiro ano, geralmente ao fim de 6 meses. Primeiro formam-se as raízes, assim como as folhas basilares, que se dispõem em roseta num caule curto, e podem ser prostadas, erectas ou semi-erectas (Januário, 1999). Normalmente são semeadas entre Abril/Maio, e colhidas entre Outubro/Novembro.

As raízes das diversas cultivares de chicória industrial são actualmente utilizadas para dois fins distintos: para a produção de sucedâneos de café (a partir de raízes de chicória torrada), e para a produção de inulina e frutose.

2.2. A Cultura

No nosso país, a cultura de chicória foi introduzida nos Açores na última década do século XIX. No início do século XX a cultura de chicória apenas existia na ilha Terceira, mas foi efectuada durante muitos anos na ilha do Faial (Oliveira, 1981). Por volta de 1889 a cultura surge no Continente, a partir de sementes trazidas da Alemanha. A intensa crise que se fez sentir na indústria de chicória, levou ao seu desaparecimento no Continente, a partir da segunda década do séc. XX.

Mas por volta de 1996, com base na experiência trazida dos Açores, a cultura voltou ao Continente tendo-se efectuaram ensaios em Pegões e Coruche, com o objectivo de testar o comportamento da cultura. A fábrica de S. Roque que existia nos Açores foi posteriormente transferida para o Continente, de forma a processar a chicória que actualmente aqui é cultivada.

Actualmente só existe esta fábrica a produzir chicória, e localiza-se na Herdade de Reguengo, situada em Mora. Os campos de cultura situam-se no Ribatejo e em 2008 repartiram-se por duas regiões: Alpiarça e Foros de Almada (Santo Estêvão). De acordo com informações colhidas no terreno, o total de área cultivada foi de aproximadamente 150 ha, e a sua produção é destinada apenas à indústria de sucedâneos de café (multinacional Nestlé).

A nível mundial os países que cultivam a chicória industrial são África do Sul, Porto Rico, Cazaquistão e maioritariamente países da Europa, dos quais Bélgica, França, Espanha, Portugal, Polónia, Eslováquia, Roménia, Croácia. Segundo os dados da FAO, verifica-se que é na Europa que o género *Cichorium* apresenta uma maior área de cultivo, e maior expressão cultural.

Observa-se pela Figura 7 que na transição de 1999 para 2000 houve uma subida acentuada da área de cultivo na Europa, sendo o aumento de 65% relativamente ao total cultivado em todo o Mundo.

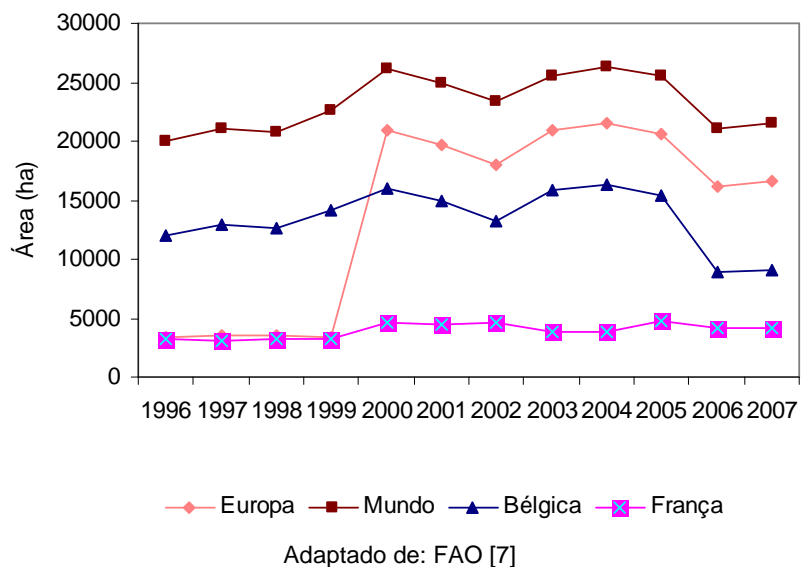
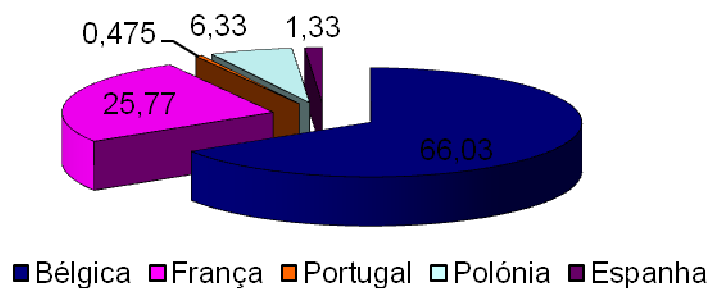


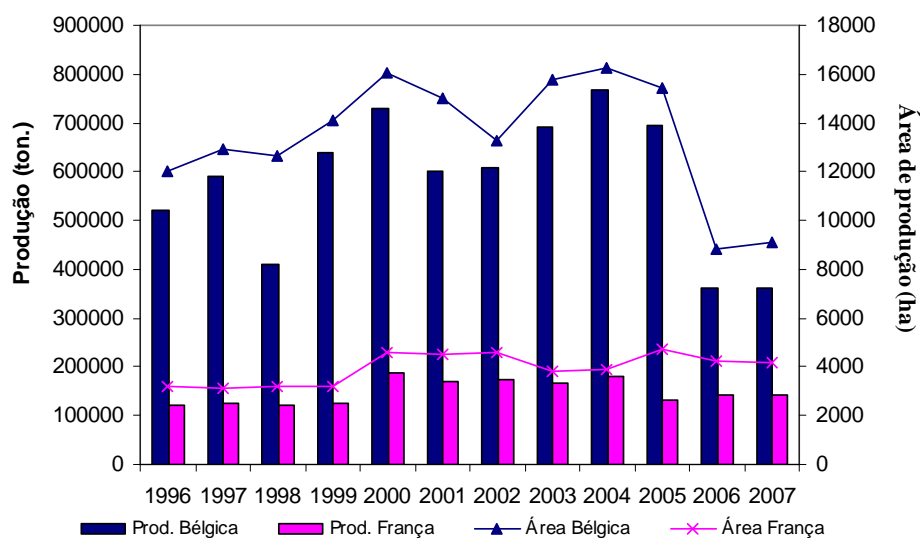
Figura 7 – Evolução da área cultivada de chicória a nível mundial.

A nível Europeu, a Bélgica é o maior produtor de raízes de chicória, seguindo-se a França (Figura 8). No ano de 2007 a Bélgica deteve cerca de 66% da produção mundial, e França 25,8%.



Adaptado de: FAO [7]

Figura 8 – Produção europeia de raízes de chicória no ano de 2007.



Adaptado de FAO [7]

Figura 9 – Produção e área cultivada na Bélgica e França.

Comparando os dois maiores produtores no período considerado no gráfico (Figura 9) verifica-se que a Bélgica tem tido uma produção de altos e baixos, mas mesmo assim continua a ser o maior produtor Europeu. No entanto, França tem-se mantido praticamente estável nos últimos anos, e verifica-se um aumento da sua produção a partir do ano 2000, sendo actualmente o segundo maior produtor.

De 2005 para 2006 a Bélgica teve uma diminuição de 52,3% da sua produção. Os dados do Quadro 9 mostram a evolução da produção mundial de raízes de chicória nos principais países europeus.

Quadro 9 – Evolução no Mundo e na Europa da produção de raízes de chicória (t), entre 2003 e 2007.

Quantidade produzida (t)					
	2003	2004	2005	2006	2007
Mundo	925 773	1 018 348	898 689	582 043	580 596
Europa	894 133	985 098	866 217	549 279	547 206
Bélgica	692 510	768 000	694 267	362 946	361 305
França	167 123	181 198	133 390	142 200	141 000
Polónia	26 000	2 6000	30 000	34 533	34 633
Espanha	6 000	6 000	6 000	7 000	7 300
Portugal	2 500	2 500	2 500	2 550	2 600
África do Sul	16 000	16 000	16 000	16 000	1 6000

Adaptado de FAO [7]

De 2004 para 2007 a produção teve uma quebra de 57%, provavelmente devido à crise que se tem sentido no sector da agricultura. Independentemente destes factos, a Europa continua a ser o maior produtor de chicória, e em 2007 produziu 94,24% das 580 596 toneladas produzidas mundialmente.

3. Métodos de obtenção laboratorial e industrial de inulina

3.1. Produção industrial de inulina

Apesar de existirem fontes vegetais ricas em inulina conforme atrás referido, esta é extraída industrialmente sobretudo a partir das raízes de chicória, sendo o material que apresenta um maior rendimento de extracção.

O processo industrial de obtenção de inulina consta da extracção por difusão em água quente. A temperatura ideal para a extracção varia entre 80-90°C, pois nesta gama de temperaturas aumenta a solubilidade da inulina, conduzindo a um extracto mais puro (Oliveira *et al.*, 2004).

Actualmente na Europa, existem algumas unidades industriais que extraem inulina a partir de raízes de chicória por um processo semelhante à extracção da sacarose a partir de beterraba sacarina, ou seja, por difusão em contra-corrente com água quente. As raízes são previamente lavadas, descascadas e cortadas em aparas finas. Segundo a empresa Orafti, (1996) este processo não altera a estrutura molecular ou a composição da inulina nativa.

Belval (1927) reportou já então que em várias refinarias alemãs se efectuava extracções de inulina a partir de chicória. As raízes são lavadas, fraccionadas e posteriormente seguem para a extracção num difusor. O líquido de difusão obtido é rico em inulina, mas também contém muitas impurezas que são removidas pelo processo de carbonatação. De seguida ocorre uma precipitação através do arrefecimento do líquido purificado. Este é atomizado e finalmente peneirado para se obter o pó branco – inulina. Para a obtenção de oligofrutose, a partir do mesmo extracto, este é parcialmente hidrolisado e purificado (Orafti, 1996).

Actualmente, as empresas que produzem e comercializam inulina em pó utilizam o método referido anteriormente, ou seja, extracção por difusão em água quente.

3.2. Obtenção laboratorial de inulina

3.2.1. Extracção aquosa de inulina

Segundo Wight e Van Niekerk (1983) a extracção aquosa a quente a partir de chicória, a uma temperatura de 80°C durante uma hora, é suficiente para que no extracto obtido esteja toda a gama de glúcidos existentes. Isto foi também verificado nos ensaios realizados por Januário (1999), cujo método de extracção da inulina foi utilizado na parte experimental deste trabalho (ver ponto 1.2.2 da parte experimental).

Park *et al.*, em 2000 propõem a obtenção de um concentrado em inulina, a partir da diminuição da temperatura do extracto que contém a inulina solubilizada, e posterior separação física. O processo tem várias fases onde as raízes são lavadas, descascadas e cortadas e, de seguida, são submetidas a uma extracção por difusão com água quente. O extracto obtido é filtrado e posteriormente concentrado. Após a concentração, o extracto é colocado numa câmara de congelação à temperatura de -50°C. Nesta etapa ocorre a separação de duas fases, ou seja, na fase sobrenadante (líquida) encontra-se os fruto-oligossacáridos e na precipitada (semelhante a um creme) a inulina de maior grau de polimerização. Após a descongelação do extracto, é feita a separação física das duas fases. Para a obtenção de inulina em pó, o extracto concentrado sofre uma secagem por atomização.

3.2.2. Liofilização dos extractos para obtenção de inulina em pó

O processo mais indicado para a preservação das raízes de chicória, bem como do seu extracto aquoso para fins analíticos é a liofilização, pois mantém inalterados a totalidade dos seus constituintes. Este processo consiste num método misto de congelação e desidratação.

Na liofilização o produto é submetido primeiramente a uma congelação e de seguida sofre uma desidratação rápida (sob vácuo), de modo a formarem-se os cristais de gelo por sublimação. Os produtos a liofilizar devem apresentar elevada superfície específica e espessura reduzida, de modo a facilitar a transferência de calor e a saída do vapor de água. (Reis, 1999).

A liofilização divide-se em 3 etapas:

1º Ocorre uma congelação (-30 a -40°C) do produto (líquido ou sólido);

2º Ocorre uma secagem primária ou sublimação, onde se elimina por sublimação a água no estado sólido (gelo);

3º Após a eliminar a totalidade de gelo no produto, termina a sublimação e inicia-se a secagem secundária ou desorção. A água ligada por adsorção é eliminada por evaporação diminuindo constantemente mas sem nunca chegar à eliminação total. A temperatura a que se efectua esta etapa pode variar entre 30º e 60ºC, segundo a natureza do produto a liofilizar.

A humidade residual pretendida para uma adequada estabilidade é específica para cada tipo de produto, e depende também do tempo previsto de conservação. As principais reacções que limitam o tempo de conservação dos produtos liofilizados, e que dependem do nível de humidade residual, são o escurecimento não enzimático, reacções de oxidação e reacções enzimáticas. A liofilização é o método de secagem por congelação mais utilizado na secagem de substâncias termosensíveis, que são instáveis em soluções aquosas (Madene *et al.*, 2006).

No entanto, em comparação com outras técnicas de secagem, nomeadamente a atomização, a liofilização é menos atractiva pois a nível económico é 50 vezes mais cara (Desobry *et al.*, 1999). O armazenamento e transporte são extremamente caros (Jacquot e Perneti, 2003), e a aplicação comercial é bastante restrita devido ao longo tempo de processamento (Barbosa-Canovas e Vaga-Mercado, 1996).

4. Encapsulamento de Compostos Bioactivos

O microencapsulamento não é uma tecnologia recente. Tem vindo a ser utilizado na indústria alimentar há já várias décadas e este processo é um dos métodos de encapsulamento mais antigos (Gouin, 2004). Gharsallaoui *et al.* (2007) referem que foi em 1930 que se preparou o primeiro encapsulado de aromas, onde se utilizou goma arábica como material de parede. Segundo os mesmos autores, o microencapsulamento define-se como sendo o processo onde partículas de muito pequena dimensão ou gotículas são envolvidas por um revestimento ou embebidas numa matriz homogénea ou heterogénea, para formar pequenas cápsulas.

Por esta técnica uma ou mais substâncias são revestidas por um material ou mistura que constitui uma barreira física com o ambiente envolvente. A parte interna pode ser denominada por material activo, encapsulado ou núcleo, e o material de revestimento intitula-se por membrana, material de parede, agente barreira ou encapsulante (Madene, 2006). Ambos podem variar tanto em espessura, composição, como em número de camadas.

As principais razões para o encapsulamento de ingredientes alimentares encontram-se descritas no Quadro 10, e agrupam-se em três diferentes grupos.

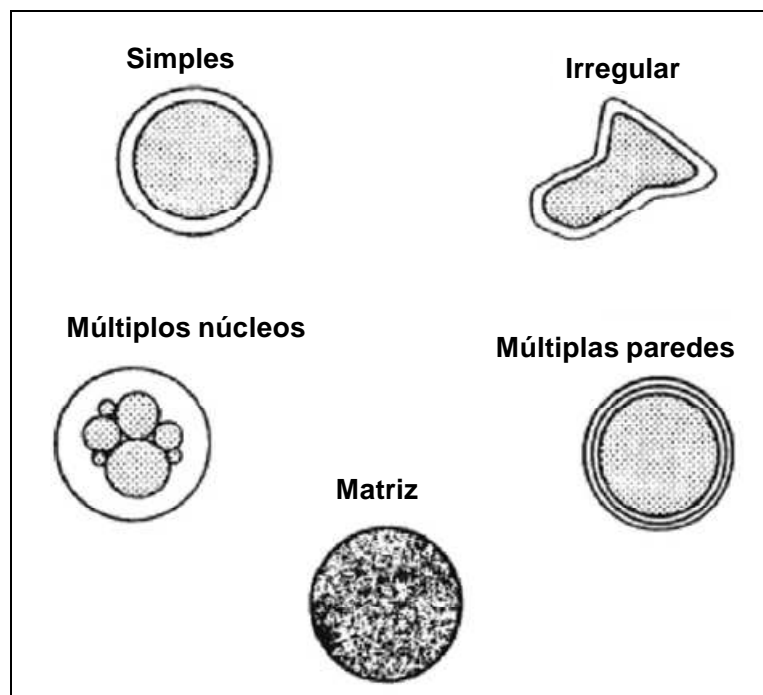
Quadro 10 – Principais razões para o encapsulamento de ingredientes alimentares

Protecção de certos ingredientes	Nutrientes importantes; ingredientes instáveis quando em contacto com outros; libertação controlada durante o processamento e armazenamento; retenção de aromas.
Melhoria dos produtos	Preservação do valor nutricional ou de aromas de modo a prolongar o prazo de validade; dissimulação de aromas ou de cores de determinados ingredientes; melhoria da sensação na boca da textura.
Simplificação do processo de fabrico	Conferir uma forma diferente (conversão de líquidos em pós ou granulados) para facilitar o seu manuseamento.

Fonte: Versic, 1988; Brazel, 1999; Clark, 2002 (Citados por: Ribeiro, 2007).

A retenção do material interno é consequência das suas propriedades químicas, solubilidade, polaridade e volatilidade. A aplicação desta técnica tem aumentado bastante na indústria alimentar, pois os materiais encapsulados encontram-se protegidos contra as diversas condições exteriores (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Na forma mais simples, a microcápsula é idealmente uma pequena esfera com parede uniforme em todo o seu redor. No entanto, a forma pode ser influenciada pela estrutura original do material interno. O tamanho das cápsulas pode variar desde micrómetros até vários milímetros (Dziezak, 1988). O tamanho e a forma das microcápsulas dependem dos materiais e métodos utilizados na sua preparação, bem como da técnica de encapsulamento. Na Figura 10 estão ilustrados os diferentes tipos de partículas que se podem obter.



Fonte: Gibbs *et al.*, 1999.

Figura 10 – Morfologia dos diferentes tipos de microcápsulas.

As partículas podem variar desde esferas rodeadas por um simples revestimento com espessura e adesividade uniformes, partículas com núcleo de forma irregular, alguns materiais bioativos embebidos numa matriz contínua do material de parede, múltiplos núcleos numa mesma cápsula e ainda microcápsulas de múltiplas paredes.

Geralmente o termo microcápsula designa partículas com dimensões situadas na gama 1-1000 μm , nanocápsula, partículas abaixo de 1 μm , e cápsula da ordem de 1 mm ou maior (Versic, 1998).

Os diferentes tipos de microcápsulas e microesferas são produzidas a partir de uma vasta gama de materiais de parede, desde monómeros e/ou polímeros, e por um vasto número de processos de encapsulamento (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Consoante o processo de encapsulamento utilizado, as matrizes podem apresentar várias formas (filmes, esferas, partículas irregulares), diferentes estruturas (porosas ou compactas) e serem amorfas ou cristalinas. Estes aspectos vão influenciar a difusão do material interno ou de substâncias externas (oxigénio, solventes), assim como a estabilidade do produto durante o tempo de armazenamento (Madene *et al.*, 2006).

Um encapsulamento de sucesso depende da escolha acertada do material de parede e da técnica de encapsulamento, sendo estes específicos para o material interno. Deste modo, é necessário entender como o material interno está organizado e protegido pelas microcápsulas, bem como perceber quais os efeitos das condições ambientais na estrutura e no comportamento dos microencapsulados (Rosenberg *et al.*, 1985).

Muitas propriedades dos encapsulados resultam da sua estrutura. Por exemplo, a retenção dos materiais voláteis e a sua protecção no produto onde irão ser incorporados, está relacionada com a porosidade e integridade das cápsulas.

As propriedades das cápsulas estão ligadas à sua estrutura e à sua morfologia. Através de técnicas de microscopia é possível estudar o interior e a estrutura das cápsulas, com elevada profundidade de campo, e com grande resolução.

4.1. Técnicas de encapsulamento

São várias as técnicas de encapsulamento utilizadas comercialmente em ingredientes alimentares. Incluem a atomização (*spray-drying*, *spray-cooling* e *spray-chilling*), extrusão, extrusão centrífuga, separação por suspensão rotacional, coacervação, inclusão molecular, leiteo fluidizante, e encapsulamento com fluído super crítico (CO₂) (Dziezak, 1988; Gibbs *et al.*, 1999)

A selecção do método de encapsulamento é baseada nas propriedades físico-químicas da substância activa e da matriz, e na sua posterior aplicação (Desai & Park, 2005).

4.2. Encapsulamento por atomização

O *spray-drying*³ é a operação unitária através da qual um produto líquido é atomizado e seco instantaneamente através duma corrente de ar quente, obtendo-se um pó. Este é o método mais utilizado na indústria alimentar para desidratar alimentos líquidos e emulsões/pastas.

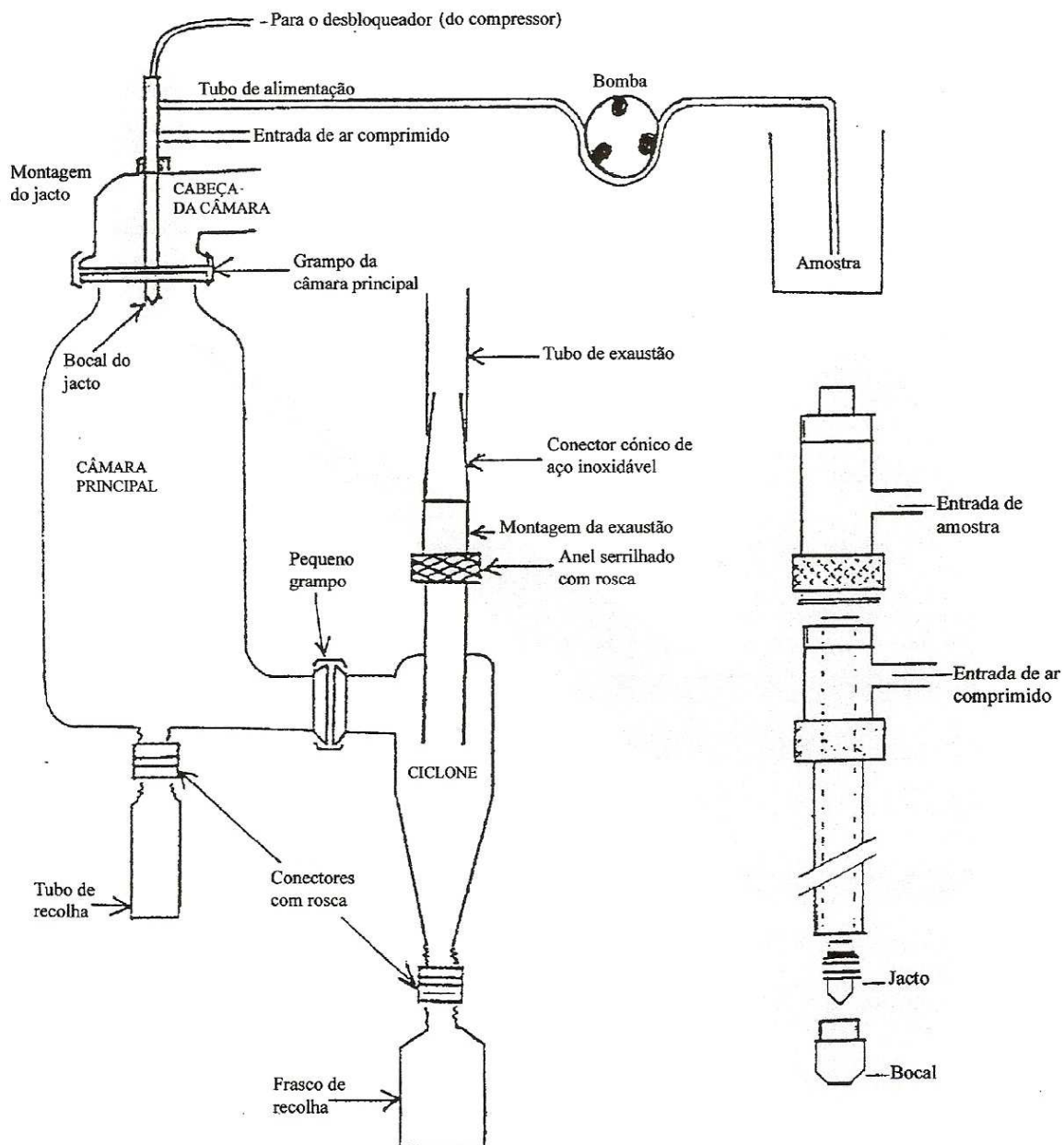
É um processo económico, flexível e produz partículas de boa qualidade. Em comparação com a liofilização, os custos de produção são cerca de 30 a 50 vezes inferiores (Desobry *et al.*, 1997). É considerado uma solução para os problemas convencionais de secagem, não só por ser um processo eficiente mas por ser bastante económico.

³ Neste trabalho o termo atomização será aplicado apenas à técnica de *Spray-drying*, apesar de incluir outras técnicas.

Devido à diminuição do teor de água e da actividade da água, a atomização é geralmente utilizada na indústria alimentar para assegurar a estabilidade microbiológica dos produtos, evitar as degradações químicas e/ou biológicas, reduzir os custos de transporte e armazenamento, e para obter propriedades específicas do produto, por exemplo, solubilidade instantânea.

Além de ser considerado um processo físico aplicado para desidratar alimentos líquidos (por ex. leite), é também utilizado como método de encapsulamento.

O equipamento utilizado neste processo é o atomizador, existindo três tipos: atomizador centrífugo ou de disco centrífugo, atomizador de pressão (*“pressure nozzle”*) e atomizador pneumático (*“two-fluid nozzle”*), de dois pulverizadores (Brennan, 2006). Este foi o tipo de atomizador utilizado na elaboração das microcápsulas de inulina deste trabalho. Possui uma abertura por onde passa o gás (normalmente ar) a elevada velocidade e temperatura. A alimentação é feita através de um orifício concêntrico, com saída de ar. Cria-se o efeito “venturi” e o líquido é convertido em spray. A pressão da bomba de alimentação é baixa e é exercida por um pulverizador de pressão. Este atomizador encontra-se representado na Figura 11.



Fonte: Ribeiro, 2007.

Figura 11 – Esquematização do atomizador pneumático utilizado na elaboração dos ensaios deste trabalho, com o pormenor do jacto atomizador.

O encapsulamento por atomização envolve três etapas básicas:

- 1º Preparação da dispersão/solução;
- 2º Homogeneização da dispersão/emulsão;
- 3º Atomização da solução/dispersão/emulsão na câmara de secagem.

Na primeira fase é efectuada a dispersão do material activo, no meio que contém a matriz encapsulante. Quando o material activo é imiscível no agente encapsulante, antes do início do processo de encapsulamento, a emulsão deve apresentar-se estável durante um determinado período de tempo (Lui *et al.*, 2001), onde as gotículas devem ser suficientemente pequenas e a viscosidade deve ser a mais baixa possível, para prevenir a inclusão de ar nas partículas (Drusch, 2006).

O encapsulamento através desta técnica é significativamente influenciado pela viscosidade da emulsão e pela distribuição do tamanho de partícula. Elevadas viscosidades interferem no processo de atomização, e levam à formação de gotículas largas e alongadas, resultando numa secagem deficiente do produto (Rosenberg, 1990).

Ao ser introduzida no atomizador a solução/emulsão irá ser conduzida até à câmara de secagem, onde circula uma corrente de ar quente. As gotículas caem sob o meio gasoso, entram em contacto com o ar quente e, a fase aquosa ao secar conduz à formação de partículas idealmente esféricas.

O curto tempo de exposição e a rápida evaporação da água da matriz encapsulante durante a solidificação mantém a temperatura do material interno abaixo dos 40°C, apesar das altas temperaturas que são utilizadas neste processo (Dubernet & Benoit, 1986). A evaporação da água ocorre devido ao reduzido tamanho das gotículas, que apresentam uma grande área superficial.

De forma a obter um encapsulamento eficiente, bem como um material de parede apropriado, devem ser utilizadas condições óptimas de secagem. Os principais parâmetros de secagem que devem ser otimizados e que condicionam as características do produto obtido são a temperatura de alimentação (amostra), a temperatura de secagem e a velocidade de alimentação (velocidade bomba).

De facto, a temperatura de alimentação modifica a viscosidade da emulsão, isto é, se a emulsão for fluida a capacidade de atomização torna-se mais homogénea. Quando a temperatura de alimentação aumenta, a viscosidade e o tamanho das gotículas devem diminuir, porém as elevadas temperaturas podem causar volatilização ou a degradação de alguns ingredientes sensíveis ao calor. Da temperatura de secagem depende a taxa de secagem e o conteúdo final em água na microcápsula. Quanto menor for a temperatura de secagem, mais lenta é a taxa de evaporação, conduzindo à formação de membranas/paredes de elevada densidade, com elevados conteúdos de água, de fraca fluidez e com facilidade de aglomeração. Ré (1998) relaciona as imperfeições superficiais, as rugosidades, as fissuras e os colapsos das partículas com uma formação mais lenta da membrana/parede durante o processo de secagem. Ao aumentar a temperatura de secagem aumenta a taxa de formação da membrana. Por conseguinte, pode-se associar a um maior número de superfícies enrugadas quando se utiliza temperaturas de secagem mais baixas (Toleni, 2008). No entanto, elevadas temperaturas de secagem podem também provocar uma excessiva evaporação o que resulta no rompimento da membrana, induzindo subsequentemente à libertação prematura e degradação ou perda do ingrediente encapsulado (Zakarian & King, 1982).

As partículas obtidas por atomização podem apresentar uma característica muito comum em substâncias amorfas. Cano-Chauca *et al.*, (2005) observaram uma forte aderência das partículas mais pequenas em torno de partículas maiores, sendo este fenómeno característico de substâncias ou materiais amorfos (Toleni, 2008).

Quanto mais elevada for a energia aplicada, mais finas serão as partículas formadas. Para a mesma quantidade de energia, o tamanho das partículas aumenta com o aumento da velocidade de alimentação (Gharsallaoui, 2007).

Ao contrário da temperatura de secagem, a temperatura de saída não pode ser directamente controlável pois depende da primeira. A temperatura de saída ideal para o encapsulamento de ingredientes alimentares, tais como aromas, tem sido reportada entre os 50-80°C.

Melhores condições de atomização implicam temperaturas elevadas, soluções com elevadas concentrações de sólidos solúveis, condições de pulverização e de secagem fáceis, de forma a evitar que ocorra a expansão e/ou ruptura das partículas formadas (Bimbenet *et al.*, 2002).

O formato da câmara de secagem também condiciona o processo. As câmaras de secagem utilizadas na indústria, podem apresentar diferentes formatos, como é possível observar em anexo (anexo 1.3) O tipo de câmara utilizada nos ensaios deste trabalho foi a câmara de fluxo em co-corrente (alínea b)). Nesta o ar entra tangencialmente à alimentação pelo topo da câmara em sentido descendente, e segue uma trajectória espiral no mesmo sentido das gotículas. Devido a este padrão de fluxo, as partículas tendem a ser projectadas contra a parede da câmara. Consequentemente, este tipo é mais indicado para soluções pouco viscosas e pouco sensíveis a temperaturas elevadas (Brennan, 2006).

Quanto mais uniforme for o processo de secagem, menor será a amplitude das partículas obtidas. As condições de secagem devem ser inicialmente definidas para que, as gotículas de maiores dimensões alcancem o teor de água desejado. O tamanho das gotículas pode afectar algumas propriedades importantes da amostra seca, nomeadamente o comportamento de re-hidratação e as propriedades de fluxo (Gharsallaoui, 2007).

As vantagens da técnica de atomização como técnica de microencapsulamento são os baixos custos de operacionalidade, elevada qualidade e rendimento de encapsulados, rápida evaporação durante a formação dos encapsulados, tamanho relativamente pequeno das partículas obtidas, e elevada estabilidade dos encapsulados. No entanto, existem algumas desvantagens entre as quais produção de cápsulas não uniformes, escolha limitada de materiais de parede (baixa viscosidade a concentrações relativamente elevadas), produção de um pó muito fino que necessita posteriormente de sofrer aglomeração, e não é aconselhável a materiais termosensíveis devido à utilização de elevadas temperaturas (Risch, 1995 & Gharsallaoui, 2007).

Uma outra desvantagem associada a este método é o facto de o material activo (interno) poder aderir ao interior da matriz, o que pode potenciar, por exemplo nos encapsulados de óleos essenciais, a oxidação e alterações do aroma no produto final (Madene, 2006).

O ar que sai arrasta algumas das partículas que se formam, e por este motivo ao nível industrial são utilizados sistemas de recuperação de modo a recuperar parte destas, e simultaneamente minimizar a poluição do meio ambiente (Brennan, 2006).

As partículas produzidas por atomização são geralmente do tipo matricial, onde o núcleo se encontra distribuído na forma de micropartículas, numa matriz seca do material encapsulante. Geralmente, os mecanismos de libertação controlada do material activo associados à técnica de atomização ocorrem por acção de solventes e por difusão (Ré, 1998).

4.3. Materiais utilizados em encapsulamento

A escolha do material de parede para o encapsulamento por atomização é muito importante, pois vai influenciar a eficiência do encapsulamento e a estabilidade dos microencapsulados. Os critérios para a selecção do material de parede são principalmente baseados nas propriedades físico-químicas tais como solubilidade, peso molecular, transição vítrea, cristalinidade, difusibilidade, formação da membrana e propriedades emulsionantes. Além destes, os custos devem ser considerados (Madene, 2006; Gharsallaoui, 2007).

O sistema de parede é concebido para proteger o material interno dos factores que podem causar a sua deterioração, de modo a prevenir a interacção prematura entre o núcleo e outros ingredientes, limitar as perdas voláteis e permitir a libertação controlada ou sustentada sob condições desejadas (Shahidi & Han, 1993). Dependendo do material interno e das características desejadas no produto final, os materiais de parede podem ser seleccionados a partir duma grande variedade de polímeros naturais e sintéticos.

Dado que a maioria dos processos de atomização na indústria alimentar são alimentados por formulações aquosas, o material de parede deve ser aceitavelmente solúvel em água (Gouin, 2004).

Segundo Santos *et al.*, (2000) e Reineccius (1988) o material de parede deve:

- Apresentar elevada solubilidade;
- Deter boas propriedades emulsionantes;
- Ter capacidade para formar filme/membrana;
- Apresentar baixa viscosidade a elevadas concentrações;
- Possuir baixa higroscopicidade para facilitar a manipulação e evitar aglomeração;
- Ter habilidade para selar e segurar o material activo dentro da estrutura da cápsula;
- Libertar completamente o solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de encapsulamento;
- Proporcionar máxima protecção ao material activo contra condições adversas (luz, oxigénio, pH e ingredientes reactivos);

- Ser solúvel em solventes comumente utilizados;
- Possuir as propriedades desejadas de libertação do material activo;
- Ser económico.

Se o material de parede utilizado no encapsulamento por atomização apresentar uma solubilidade em água limitada, os encapsulados resultantes formam uma estrutura do tipo matriz. Por conseguinte, o material activo encontra-se disposto em pequenas gotículas embebidas numa matriz e revestidas pelo material de parede (“*wall matrix*”) (Madene, 2006).

São utilizados vários biopolímeros em encapsulamento por atomização, isolados ou em mistura, e de várias fontes entre as quais gomas (goma arábica, alginatos, carragenatos, etc.), proteínas (proteínas do leite, trigo ou soja, gelatina), lípidos (ácido esteárico, mono e diglicéridos), polissacáridos (amidos, maltodextrinas, xaropes de milho) e ceras (Gibbs, 1999; Saénz, 2009).

No entanto, os materiais mais utilizados por este método são glúcidos de baixo peso molecular, por exemplo maltodextrinas com diferentes dextrose equivalente, proteínas de soro de leite ou proteínas de soja, gelatina e hidrocolóides como a goma arábica. As maltodextrinas são das mais usadas na indústria alimentar por serem muito versáteis, e são obtidas por hidrólise ácida de vários tipos de amido (milho, batata ou outros). Geralmente apresentam elevada solubilidade em água, baixa viscosidade, e formam soluções de sabor e coloração neutras (Gibbs *et al.*, 1999).

Visto que a funcionalidade química, a solubilidade e a difusão através da matriz formada determinam o grau de retenção dos componentes no interior das partículas, durante a preparação dos encapsulados, a eficiência do encapsulamento e a estabilidade dos encapsulados durante o armazenamento são largamente dependentes da composição do material de parede. Os glúcidos, tais como o amido, as maltodextrinas e os xaropes de milho são usualmente utilizados no encapsulamento de ingredientes alimentares. No entanto, os materiais de parede baseados nestes componentes possuem fracas propriedades interfaciais e têm que ser modificadas quimicamente, de modo a melhorar a sua actividade superficial (Saénz, 2009). O uso de glúcidos de baixo peso molecular em encapsulados obtidos por esta técnica está frequentemente associado a problemas de aglomeração, colapso e re-cristalização de glúcidos amorfos durante o armazenamento (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Esta técnica não é a mais adequada na secagem de alimentos ricos em açúcar e ácidos orgânicos, isto porque apresentam um comportamento viscoso devido às suas características de adesividade (“stickiness”). Este termo é utilizado para descrever o fenómeno de coesão entre partículas, e a sua adesão à parede da câmara durante o processo de secagem (Truong, 2009).

4.4. Inulina como agente encapsulante

Um material de parede com possível interesse no encapsulamento de compostos bioactivos é a inulina. Devido às suas propriedades funcionais/nutricionais, as indústrias alimentar e farmacêutica utilizam a inulina em produtos comerciais. Por outro, a produção de encapsulados funcionais com libertação controlada poderá ser bastante interessante para outras aplicações nestas áreas.

Por pertencer ao grupo dos polissacáridos, acredita-se que tenha um comportamento semelhante ao dos amidos modificados, que são bastante utilizados em encapsulamento por atomização. Alguns autores têm estudado o comportamento da inulina no encapsulamento:

- ✓ Crittenden *et al.*, (2006) estudaram o microencapsulamento de probióticos (cultura de *Bifidobacterium infantis*), por atomização. Como matriz encapsulante utilizou-se uma emulsão (“film-forming protein-carbohydrate-oil emulsion”) constituída por uma proteína (caseína), um glúcido (fruto-oligossacárido: Raftilose P95) e um lípido (óleo vegetal). O prebiótico fez parte da matriz encapsulante, proporcionando um efeito sinérgico, ou seja, simbiótico. No entanto, a maioria dos microrganismos não sobrevive às condições utilizadas neste processo, tais como temperaturas muito elevadas e condições osmóticas extremas (Selmer-Olsen *et al.* 1999; Silva *et al.*, 2002). Esta técnica não é a mais indicada para a preservação de culturas vivas, pois ao final de algumas semanas de armazenamento à temperatura ambiente, perdem a sua actividade. Este facto está associado ao stress que é induzido pelas alterações de temperatura, alterações de fases e de secagem. A combinação destes factores conduz a danos na membrana celular. Têm sido estudadas algumas fibras solúveis com o objectivo de proteger os probióticos das condições de secagem. No caso da inulina e da polidextrose, estas demonstram não serem eficazes no aumento da viabilidade de probióticos durante a secagem ou durante o armazenamento (Corcoran *et al.*, 2005)

- ✓ Dobre *et al.*, em 2008 extraíram inulina a partir de raízes de chicória e os extractos de inulina obtidos foram encapsulados em micropartículas de agár, para posterior libertação controlada. À solução inulina-agár adicionaram uma fase oleosa sob constante agitação, para se obter partículas sólidas de forma esférica, onde o diâmetro dependia da taxa de agitação. As partículas de agár resultantes apresentavam um tamanho de partícula entre 400-800 µm.
- ✓ Poulain *et al.*, em 2003 utilizaram o método de coacervação para formar microesferas de inulina e de inulina acetato, em associação ou não com o ácido 1,12 – dodecanedicarboxílico. Estes biopolímeros compatíveis conduziram a microesferas com cerca de 0,5-5 µm de diâmetro. O composto activo encapsulado foi o BABCH (“bis amidinobenzylidene cycloheptane” - inibidores de proteases de serina).
- ✓ Saénz *et al.*, em 2009 estudaram o microencapsulamento de compostos bioactivos do figo da Índia (*Opuntia ficus-indica*), utilizando como agentes encapsulantes a maltodextrina e inulina. O método de encapsulamento foi a atomização.

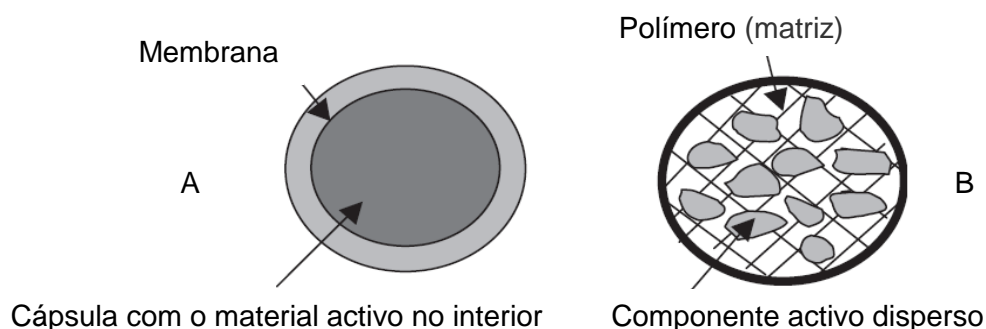
Toledo *et al.*, em 2008 estudaram o efeito da humidade na microestrutura da inulina em pó, e obtiveram resultados importantes para a elaboração deste trabalho. Partiu de um extracto de inulina obtido a partir de raízes de chicória, com uma concentração de sólidos solúveis de 22% (m/m). Este extracto foi submetido a uma congelação e posterior descongelação, com o objectivo de isolar a inulina de maior grau de polimerização. O extracto obtido foi atomizado a uma temperatura de 210°C, e o produto resultante constituía microcápsulas de inulina com um diâmetro médio entre 0,74 e 9,71 µm. Esta gama de valores é muito próxima da obtida neste trabalho (ver mais à frente - parte experimental: pontos 4.1. e 4.2.).

O efeito da temperatura de atomização, bem como a adição de agentes encapsulantes na microestrutura da inulina, foi investigado por Nogueira (2001). Chegou à conclusão que as soluções atomizadas à temperatura de 130°C originaram partículas esféricas de diversos tamanhos e com superfícies enrugadas, em toda a extensão das cápsulas. Ao aumentar a temperatura para 200°C verificou a formação de partículas igualmente esféricas, mas com uma superfície mais homogénea e menos enrugada. A formação de partículas com superfícies enrugadas é uma característica indesejável, e muito frequente em polímeros. Leite *et al.*, (2002) evidenciaram a formação de maior rugosidade na superfície das partículas, quando uma solução rica em inulina sofre um processo de secagem a temperaturas inferiores a 193°C.

4.5. Compostos bioactivos

Actualmente são vários os ingredientes alimentares que suscitam grande interesse na área do encapsulamento. Os aromas (compostos aromáticos - óleos essenciais) são os ingredientes mais utilizados em encapsulamento. Mas para além destes, são ainda utilizadas algumas gorduras e oleoresinas, carotenóides, antioxidantes, vitaminas, minerais, entre outros (Madene, 2006).

O encapsulamento é aplicado para a retenção de aromas durante o armazenamento de produtos alimentares, de modo a proteger os aromas de interacções indesejáveis, minimizar as interacções aroma/aroma, proteger contra reacções induzidas pela luz e/ou oxidação, aumentar o tempo de vida útil e/ou permitir uma libertação controlada. A Figura 12 ilustra as possíveis formas de como os aromas podem estar encapsulados. Assim, podem estar encapsulados numa microcápsula que contém o material activo envolto numa membrana, ou dispersos numa matriz (microesfera).



Fonte: Madene. *et al.*, 2006.

Figura 12 – Ilustração das possíveis formas do encapsulamento de aromas. A – Microcápsula; B – Microesfera.

A maior parte dos componentes aromáticos que fornecem aos alimentos o seu aroma característico são altamente voláteis. Por esta razão, perdem-se facilmente durante a operação de atomização, mas esta é a técnica mais utilizada para o encapsulamento de aromas, apesar de serem muitas as técnicas descritas. O rendimento máximo em aroma nas diferentes técnicas de encapsulamento está representado no Quadro 11.

Quadro 11 - Características de alguns processos de encapsulamento

Encapsulamento	Processo	Diâmetro	Rendimento
Processos químicos	Coacervação simples	20-200	<60
	Coacervação complexa	5-200	70-90
	Inclusão molecular	5-50	5-10
Processos físicos	Spray-drying	1-50	<40
	Spray-chilling	20-200	10-20
	Extrusão	200-2000	6-20
	Leito fluidizado	>100	60-90

Adaptado de: Madene, *et al.*, 2006

A retenção do aroma é conduzida por factores relacionados com a natureza química do material activo, incluindo o peso molecular, funcionalidade química, polaridade e volatilidade relativa, propriedades e natureza do material de parede e tecnologia de encapsulamento (Madene *et al.*, 2006).

Os materiais solúveis em água também podem se encapsulados. No entanto, em vez de se definir claramente qual o material interno e o agente encapsulante, o produto consiste numa mistura homogénea de um polímero que contém aprisionado o material interno. Por vezes, estes produtos são descritos como “matriz de partículas” ou “ingredientes encapsulados”. Assim, estes materiais deverão estar protegidos por uma película ou revestimento bastante finos (Dziezak, 1988).

A incorporação de pequenas quantidades de aromas em alimentos pode influenciar grandemente a qualidade do produto final, os custos, e a satisfação do consumidor. A indústria alimentar está a desenvolver continuamente ingredientes, métodos de processamento e materiais de embalagem, de forma a melhorar a preservação dos aromas.

II – PARTE EXPERIMENTAL

Antes de iniciar os ensaios relativos ao encapsulamento de óleo de orégão, foram elaborados alguns ensaios preliminares com inulina comercial e com extractos de inulina. Nesta primeira fase o objectivo foi identificar quais das amostras seleccionadas formaria cápsulas nas melhores condições, em termos de dimensão e forma, e verificar qual dos métodos (liofilização e atomização) seria o mais indicado para a formação de cápsulas de inulina.

Numa segunda fase e com base nos resultados observados nos ensaios preliminares, seguiu-se um delineamento experimental central composto não factorial (RSM) com uma matriz de inulina (amostra comercial de inulina – Raftiline), com o objectivo de otimizar as condições de secagem, e verificar qual das variáveis (concentração de sólidos solúveis e temperatura de secagem) teria maior influência nas características da superfície e diâmetro das partículas.

Na terceira e última fase procedeu-se ao encapsulamento, com a mesma amostra de inulina comercial (Raftiline) como agente encapsulante e óleo essencial de orégão como modelo de material bioactivo. Efectuou-se novamente um delineamento experimental central composto não factorial (RSM) com a mesma matriz de inulina, mas com óleo de orégão incorporado.

1. Ensaios Preliminares de preparação da inulina como agente encapsulante

1.1. Material

Foram seleccionados dois tipos de amostras para os ensaios preliminares: amostras de inulina comercial, e extractos de inulina extraídos no laboratório a partir de raízes de chicória liofilizadas.

As quatro amostras de inulina comercial usadas foram: Fibrulose 97 (FOS), Frutafit CLS (FOS/inulina), Baneo HPX (inulina) e Raftiline ST (inulina). No Quadro 12 encontra-se indicada a composição mais detalhada de cada uma das amostras comerciais.

Quadro 12 – Composição (em % matéria seca) e propriedades tecnológicas, das amostras comerciais utilizadas na elaboração dos ensaios preliminares.

Amostra	% Inulina/FOS	% Glucose/ Frutose/ Sacarose	Grau de polimerização	Poder edulcorante	Prop. Técnicas
Fibrulose 97 (Cosucra) Semelhante à Orafti P95	95 (FOS)	5	GP < 10	Moderado 30%	35% de solubilidade; Baixo aw; Não tem efeito sob a textura
Frutafit CLS (Sensus) Semelhante à Orafti HIS	86 (Inulina/FOS)	14	GP: 2-10	Moderado 25%	Inulina com elevada solubilidade
Baneo HPX (Orafti)	100 (Inulina)	0	GPm ≥ 23	Não tem	Inulina com elevada capacidade para substituição de gorduras a elevadas temperaturas
Raftiline ST (Orafti)	> 90 (Inulina)	< 10	GPm ≥ 10	10%	Inulina padrão para formar géis de elevada dispersibilidade

Adaptado de: www.sensus.nl, www.orafiti.com, www.cosucra.com

Para além destas foram também preparados extractos de inulina. Partiu-se de uma amostra constituída por uma mistura de 6 raízes de chicória (colhidas 6 meses após a sementeira), liofilizadas e moídas. Preparou-se dois tipos de extractos a partir desta mistura, através de duas metodologias diferentes.

1.2. Metodologia

1.2.1. Preparação das amostras comerciais de inulina

As amostras de inulina comercial foram dissolvidas em água destilada com auxílio de um agitador e com aquecimento, a diferentes concentrações. Preparam-se soluções com diferentes concentrações, duas com 5% de SS (Baneo HPX e Raftiline ST) e duas com 10% (Fibrulose 97 e Frutafit CLS). Foram seleccionadas diferentes concentrações pois as amostras apresentam graus de solubilidade diferentes, consoante o seu grau de polimerização.

Posteriormente preparam-se apenas duas soluções partindo de duas amostras, tendo em conta o seu teor em FOS e inulina, ou seja, utilizou-se a Fibrulose 97 (maior teor em FOS) e a Baneo HPX (maior teor em inulina).

1.2.2. Obtenção de inulina no laboratório

O método utilizado para a extracção de inulina foi a extracção aquosa a quente, proposto por Januário (1999). Para se conseguir uma quantidade de inulina em pó suficiente para estes ensaios, repetiu-se 6 vezes o procedimento de extracção que a seguir se descreve.

Retirou-se uma toma de 1,25g da amostra de chicória liofilizada para um erlenmeyer, e adicionou-se 40 ml de água destilada. Homogeneizou-se a mistura e colocou-se num banho de água a 80° C, durante uma hora com agitação moderada. A solução foi depois a centrifugar durante 20 minutos a uma velocidade próxima de 3500 rpm. Após a centrifugação procedeu-se à separação das duas fases, por filtração rejeitou-se o depósito e aproveitou-se o sobrenadante.

O extracto obtido foi de seguida concentrado num evaporador rotativo sob vácuo, a uma pressão próxima dos 170 mmHg/Torr e à temperatura de 60-70°C. A concentração durou cerca de duas horas e meia, até se atingir uma concentração próxima da desejada (5% de SS). Dado que este extracto concentrado tinha na sua constituição toda a gama de glúcidos presentes na chicória, denominou-se extracto total de inulina.

Com o objectivo de obter uma amostra de inulina de maior grau de polimerização (GP), realizou-se uma segunda extracção, pelo mesmo procedimento anteriormente descrito, mas com uma diferença: após a centrifugação, o extracto foi congelado a uma temperatura aproxima dos -40°C, durante dois dias. O processo de congelação teve como objectivo separar por precipitação a inulina de maior GP. Ao descongelar observou-se a separação de duas fases, uma sobrenadante e uma fase precipitada. Para uma separação mais eficiente, efectuou-se uma centrifugação durante 20 minutos a 3500 rpm. Rejeitou-se o sobrenadante (por filtração rápida), e recuperou-se o precipitado correspondendo à fracção do extracto de inulina de maior GP. Ao precipitado de inulina adicionou-se água destilada, de forma a ficar com a concentração final de 5% de SS.

1.2.3. Atomização das amostras de inulina

Todas as soluções de inulina, quer comerciais quer os extractos, foram secas num atomizador pneumático (“*two-fluid nozzle*”), de modelo LAB-PLANT SD-05 à escala laboratorial, submetidas às mesmas condições de secagem: temperatura de entrada de 120°C, velocidade da bomba de 5,8 mL/min, pressão e fluxo de ar máximos. A temperatura de saída das amostras foi de 50±10°C (parâmetro não controlável). Foi utilizada uma temperatura de secagem de 120°C como referência, visto estudos de encapsulamento com outros materiais de parede estarem a decorrer a esta temperatura no laboratório.

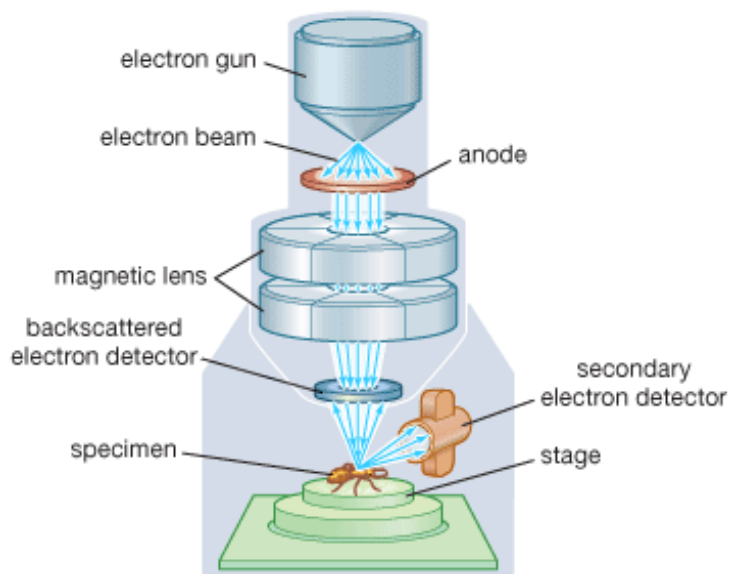
1.2.4. Liofilização das amostras comerciais como alternativa à atomização

As soluções preparadas a partir de amostras comerciais de inulina, nomeadamente a Fibrulose 97 e a Baneo HPX, foram liofilizadas com o mesmo propósito de verificar se a liofilização é um processo capaz de formar microestruturas com potencial encapsulante. Tendo em conta que cada ciclo de liofilização demora cerca de 48 horas para remover no máximo 500g de água, prepararam-se 200g de solução para cada uma das amostras (Fibrulose e Baneo).

1.2.5. Visualização das amostras por Microscopia Electrónica de Varrimento

As visualizações das estruturas formadas foram efectuadas com recurso à microscopia electrónica de varrimento.

O microscópio electrónico de varrimento (MEV) funciona de forma similar ao microscópio óptico, mas a fonte luminosa é substituída por um feixe de electrões que são acelerados por um potencial eléctrico, e condensados com recurso a um conjunto de lentes electromagnéticas num pequeno feixe. No final, lentes objectivas focam o feixe na superfície da amostra. Todos os componentes do microscópio contêm no seu interior uma câmara de vácuo, de modo a minimizar a interacção entre os electrões e o ar, para que estes não sejam absorvidos pelo ar [12]. O feixe é reflectido num detector, sendo construída uma imagem que permite ao observador ver abaixo da resolução de 10 nm, e observar os detalhes pormenorizados da estrutura do material. A Figura 13 ilustra os principais constituintes do microscópio electrónico de varrimento.



© 2008 Encyclopædia Britannica, Inc.

Fonte: [13]

Figura 13 – Esquematização do microscópio electrónico de varrimento.

Uma vez que as amostras não são metálicas, ou seja, não são materiais condutores, antes de serem visualizadas ao microscópio electrónico foram fixadas em um porta-amostras com fita adesiva de dois lados e submetidas a um banho de ouro (mistura de 95% ouro + 5% de paládio), num “sputter coater” Polaron E5350, de forma a aumentar o sinal observado.

Utilizou-se um microscópio electrónico de varrimento JOEL JSM-5410, com uma voltagem de aceleração de 10kV. As imagens foram captadas digitalmente e posteriormente tratadas pelo programa SemAfore versão 5.0.

2. Optimização das condições de formação das microcápsulas de inulina

Com base nos resultados obtidos nos ensaios preliminares e de forma a melhorar o tamanho e a forma das microcápsulas de inulina, houve a necessidade de otimizar as condições de secagem por atomização.

2.1. Material

O material utilizado nos ensaios consistiu numa amostra comercial de Raftiline ST. Selecionou-se esta amostra pelo facto de apresentar um comportamento, em termos de características físicas e químicas muito semelhantes à da inulina que foi extraída no laboratório.

2.2. Metodologia de Superfície de Resposta (RSM)

Utilizou-se a metodologia de superfície de resposta (RSM), com o objectivo de identificar e verificar quais os factores que mais influenciam o tamanho de partícula. O delineamento experimental consistiu de onze ensaios e a sequência destes estão indicados no Quadro 13. A informação detalhada encontra-se em anexo (anexo 3.2). Como variáveis independentes (factores) seleccionou-se a temperatura de secagem (120-190°C) e a concentração de sólidos solúveis (5-25%).

Quadro 13 – Sequência dos ensaios elaborados para a matriz de inulina.

Ensaio	% SS	T (°C)
1º	5	120
2º	5	190
3º	25	120
4º	25	190
5º	5	155
6º	25	155
7º	15	120
8º	15	190
9º	15	155
10º	15	155
11	15	155

As amostras foram dissolvidas em água destilada previamente aquecida até cerca de 80°C, e após o arrefecimento foram atomizadas. As condições de atomização foram idênticas para todos os ensaios no respeitante à velocidade da bomba (5,8 mL/min), à pressão e ao fluxo de ar (máximos). Os resultados foram analisados estatisticamente, pelo programa Statistica 6.0.

3. Encapsulamento de compostos bioactivos, usando como modelo óleo essencial de orégão

Os estudos de encapsulamento em matriz de inulina prosseguiram utilizando óleo essencial de orégão (OE) como material encapsulante. O delineamento experimental seguido foi semelhante ao descrito anteriormente, e a concentração de OE utilizado, para todos os ensaios, foi de 15% (m/m) referente à inulina.

3.1. Material

Para o encapsulamento foram utilizados como materiais uma amostra de inulina comercial (Raftiline ST) e óleo essencial de orégão obtido partir das folhas e de flores do Orégano (*Origanum V.*), extraído por arrastamento de vapor.

3.2. Metodologia

3.2.1. Preparação da emulsão óleo:inulina e encapsulamento

Para cada um dos ensaios (onze) preparou-se 100g de solução. Dissolveu-se a inulina comercial em água destilada pré-aquecida (70-80°C). Após o arrefecimento da solução à temperatura ambiente, adicionou-se 15% de óleo, tendo como base a quantidade de inulina adicionada (5, 15 ou 25% de SS de inulina). Antes da secagem por atomização, a emulsão foi homogeneizada num ultra-Turrax (IKA Labortechnik T25 basic), com uma agitação de 800rpm durante aproximadamente 30 segundos. A proporção inulina:óleo foi de 1:6.

Seguiu-se um delineamento experimental central composto não factorial (RSM) com a mesma matriz de inulina, mas com óleo de orégão incorporado. Durante todo o processo de secagem e em todos os ensaios, as emulsões foram mantidas sob constante agitação. As amostras obtidas foram observadas por Microscopia Electrónica de Varrimento (MEV) e Microscopia Confocal de Fluorescência.

Os ensaios correspondentes à metodologia RSM encontram-se no Quadro 14.

Quadro 14 – Sequência dos ensaios da matriz de inulina com óleo

Ensaio	% Óleo	% SS	T (°C)
1º	0,75	5	120
2º	0,75	5	190
3º	3,75	25	120
4º	3,75	25	190
5º	0,75	5	155
6º	3,75	25	155
7º	2,25	15	120
8º	2,25	15	190
9º	2,25	15	155
10º	2,25	15	155

Antes da elaboração do delineamento experimental seleccionou-se um ponto da matriz (ponto 2 da parte experimental) onde se observou os melhores resultados, em termos de superfície de partícula e diâmetro médio. Para além de inulina e do óleo essencial de orégão a emulsão continha 2,25 mg de β -caroteno, pois em trabalhos anteriores verificou-se que é auto-fluorescente, funcionando assim como marcado do óleo de orégão em Microscopia Confocal de Fluorescência.

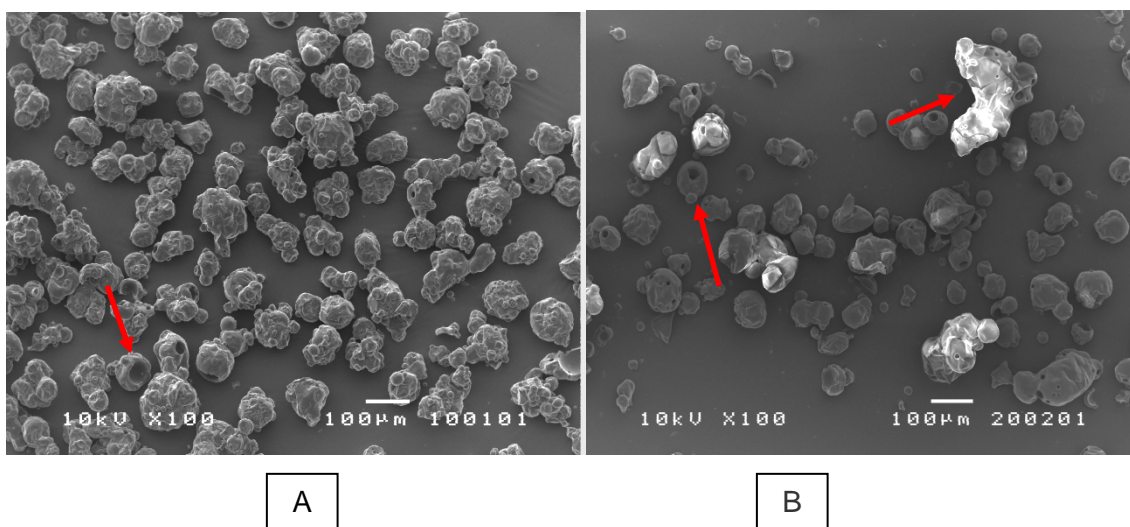
Esta técnica utiliza uma fonte de luz, onde somente um pequeno ponto é iluminado e observado num determinado intervalo de tempo. Desta forma, uma imagem é construída através de um varrimento de pontos do campo. As fontes de luz podem ser convencionais ou de laser, e são possíveis fluorescências ou observações transmitidas. A obtenção de imagens sucessivas de diferentes planos da mesma amostra possibilita a construção de imagens tridimensionais fixas ou em movimento.

4. Resultados e discussão

4.1. Ensaio preliminares

4.1.1. Estrutura das amostras comerciais e dos extractos de inulina nativa

As amostras de inulina comercial obtidas industrialmente por atomização e que não foram sujeitas a qualquer tratamento no laboratório, quando observadas ao microscópio apresentavam microestruturas de inulina de fraca homogeneidade. Como se pode observar pela Figura 14, ainda revelaram muitas perfurações e imperfeições à superfície dessas estruturas.



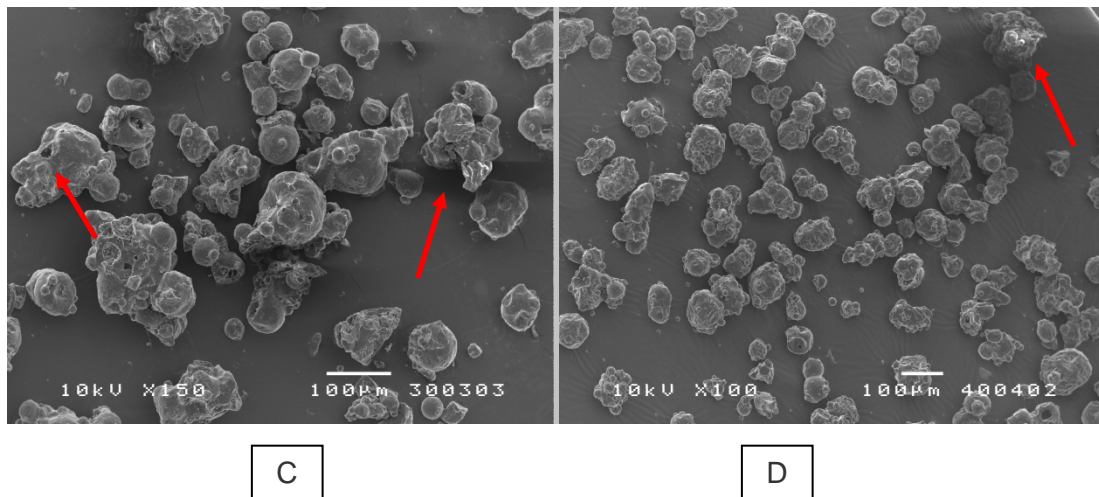


Figura 14 – Imagens obtidas por MEV (ampliações 100X e 150X) das amostras comerciais de inulina: A – Fibrulose 97 (Cosucra), B – Frutafit (Sensus), C – Baneo HPX (Orafti) e D – Raftiline (Orafti).

Deste modo, estas quatro amostras sem tratamento foram rejeitadas para futuras utilizações enquanto nesta forma.

No entanto, verificou-se que as amostras de inulina comercial que foram novamente dissolvidas e atomizadas em laboratório apresentaram formação de microcápsulas de inulina, com forma esférica e bastante homogêneas entre si. Os diâmetros médios das partículas obtidas variaram entre 3 e 5,2 μm , como se pode observar na Figura 15, que ilustra as distribuições de frequências das quatro amostras comerciais.

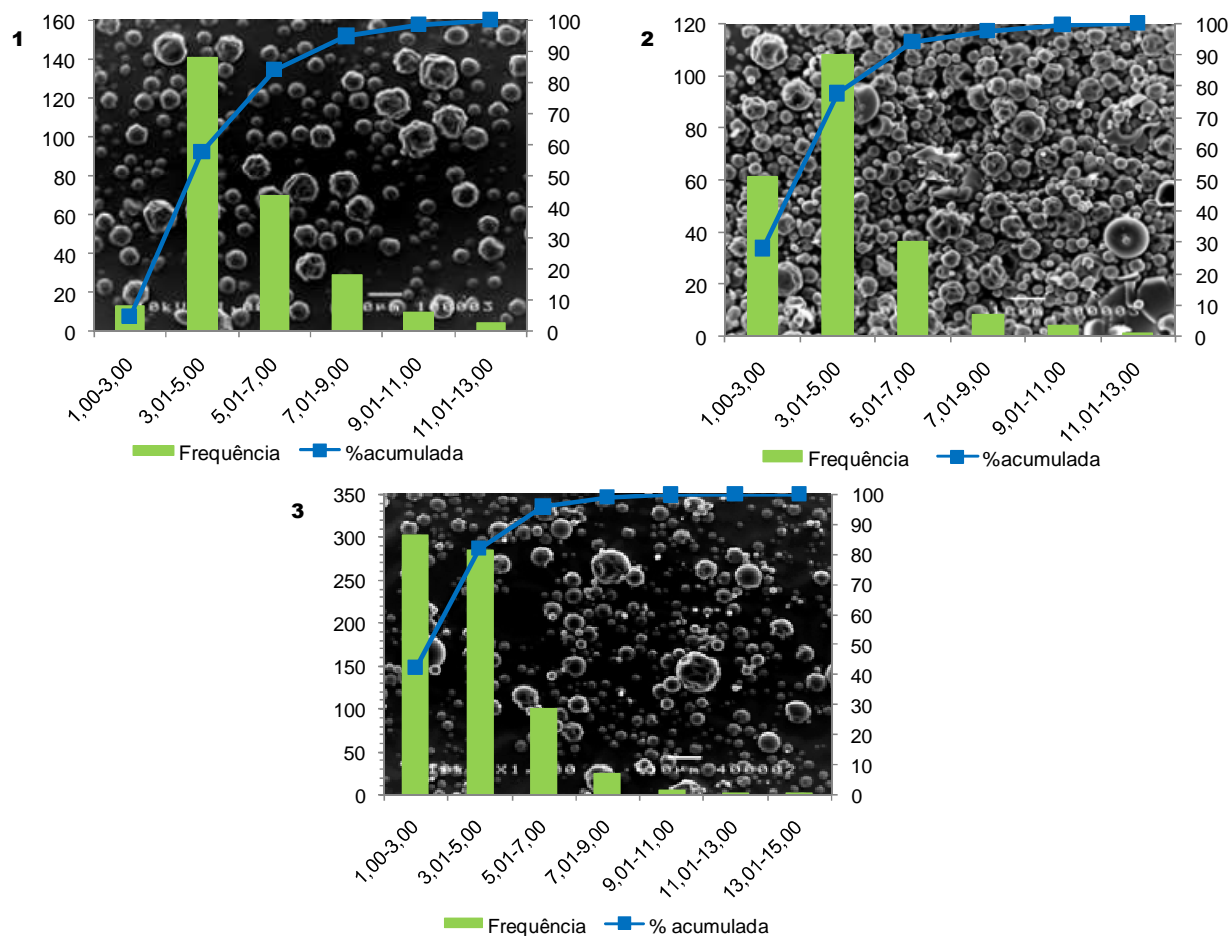


Figura 15 – Microestrutura e distribuição de frequências das amostras comerciais de Fibrulose 97 (1), Baneo HPX (2) e Raftiline ST (3) (MEV, ampliação 1000x).

Na Figura 16 encontram-se ilustradas as microestrutura dos extractos de inulina nativa, obtidos no laboratório.

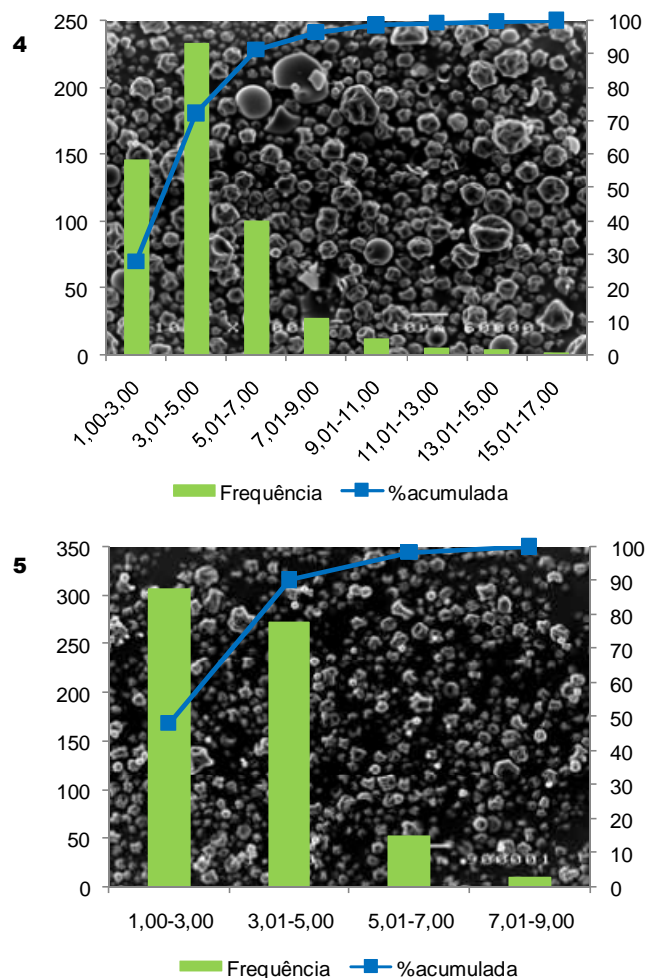


Figura 16 – Microestrutura e distribuição de frequências dos extractos de inulina nativa total (4) e de maior grau de polimerização (5) (MEV, ampliação 1000x).

Em relação à inulina de chicória extraída no laboratório, se compararmos a microestrutura do extracto de inulina total e a de maior GP, verificou-se que ambas formaram microcápsulas, com diâmetros médios de partículas de 4,26 µm e 3,26 µm, respectivamente (ver Figura 16).

Relativamente às amostras comerciais que foram liofilizadas (Fibrulose 97 e Baneo HPX), estas não desenvolveram qualquer tipo de estrutura com potencial de encapsulamento. Pela Figura 17 observa-se essas amostras comerciais, sujeitas ao processo de liofilização, confirmando-se assim a ausência de estruturas encapsuladas.

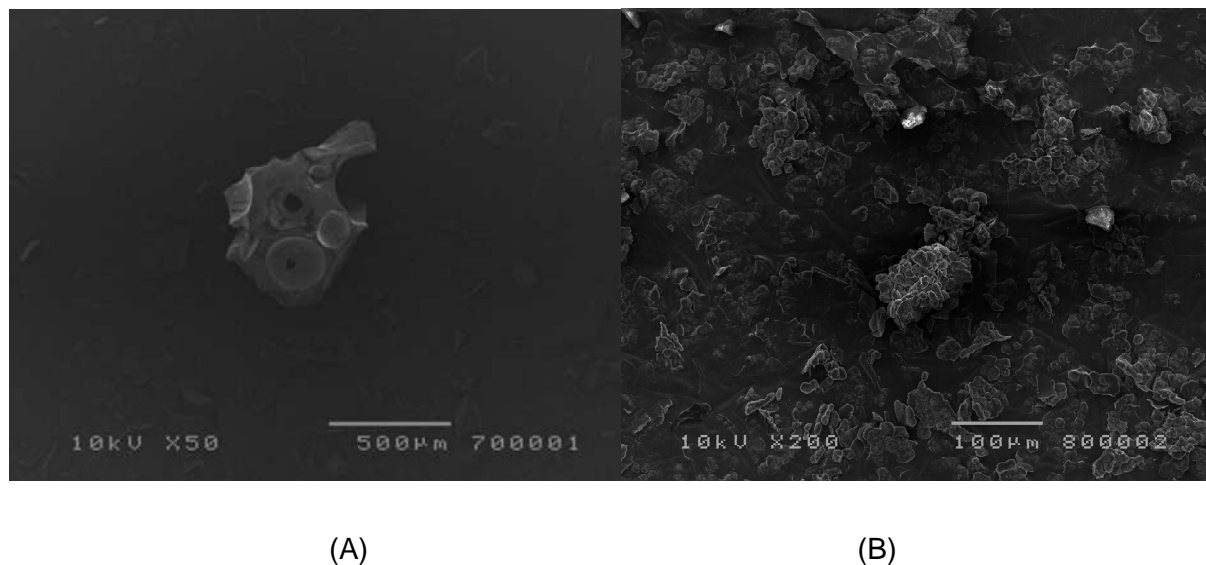


Figura 17 – Microestrutura das amostras comerciais liofilizadas: (A) Fibrulose 97 e (B) Baneo HPX (MEV, ampliação 200X).

Por outro lado, em relação à amostra de extracto total inulina nativa liofilizado observou-se a formação de microvesículas, como se pode observar pela Figura 18. Este aspecto não permite concluir se houve ou não a formação de estruturas de encapsulamento, pois o que se observou não se assemelha às típicas cápsulas de inulina, que se obtiveram por atomização.

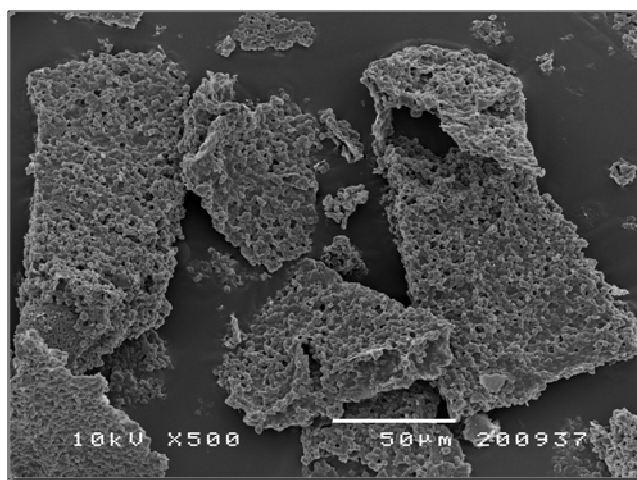


Figura 18 – Microestrutura da inulina nativa total liofilizada (MEV, ampliação 500x).

Conclui-se assim que a liofilização não é o método mais adequado para a formação de cápsulas de inulina, e provavelmente para o encapsulamento de compostos bioactivos, utilizando como agente encapsulante a inulina.

4.1.2. Comparação estatística das amostras

A aplicação duma análise de variância (ANOVA) ao conjunto de dados obtidos, teve como objectivo verificar se as amostras eram significativamente diferentes entre si. Conclui-se com 95% de confiança (nível de significância de 5%) que os diâmetros são significativamente diferentes pois o *p-value* associado ao teste F é praticamente zero (ver anexo 2.1).

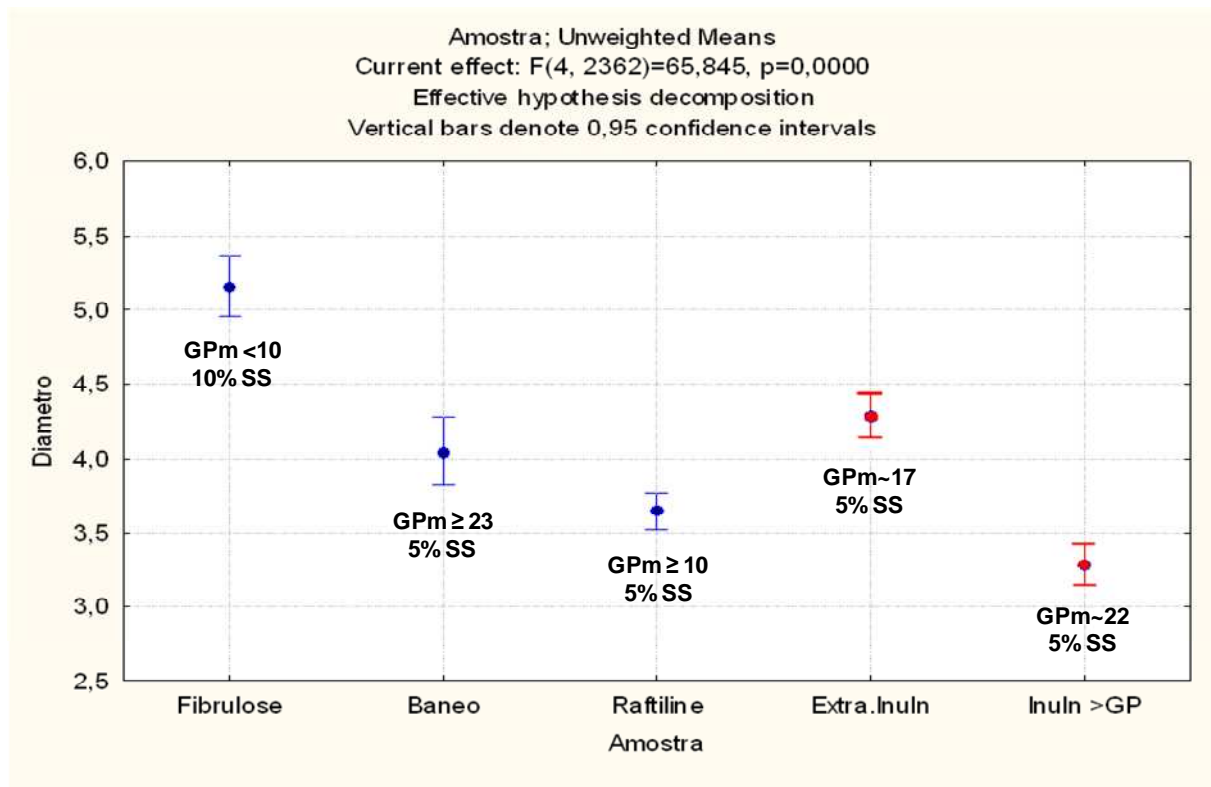


Figura 19 – Gráfico dos diâmetros médios de partícula e intervalos de confiança em torno da média.

Pela Figura 19 confirma-se o resultado da análise ANOVA. Os valores de GP expressos no gráfico baseiam-se nas especificações técnicas das amostras comerciais e nos valores obtidos por Simão (2004), no caso dos extractos obtidos no laboratório.

Se compararmos o GP com o diâmetro médio dos extractos de inulina obtidos no laboratório, verifica-se uma tendência para a diminuição do diâmetro médio, quando o GP aumenta. Observa-se a mesma tendência para as amostras comerciais de inulina. As amostras Baneo (GP≥23) e Raftiline (GP≥10) apresentam um GP diferente, mas como foram obtidas industrialmente não se conhece o seu GP médio (GPm) exacto.

Pelo teste de Tukey (ver anexo 2.2) verificou-se que a amostra comercial Baneo e o extracto de inulina nativa total não são significativamente diferentes entre si. Assim, conclui-se que estas amostras apresentam um GP semelhante ou próximo.

4.2. Optimização das condições de formação das cápsulas de inulina

Seleccionou-se a amostra de inulina comercial Raftiline ST pelo facto de apresentar um comportamento, em termos de características químicas e tecnológicas, semelhante à inulina de maior GP que foi extraída em laboratório. O extracto total de inulina nativa total obtido em laboratório, para além de conter inulina de maior GP contém também moléculas mais pequenas (FOS).

Ao comparar com os resultados dos ensaios anteriores, verifica-se uma melhoria significativa da superfície de partícula. Em termos gerais, estas apresentam-se mais lisas e com menos imperfeições, embora possam existir algumas variações, consoante a concentração de SS e a temperatura de secagem, utilizadas para cada ensaio. As Figura 20 e Figura 22 ilustram as microestruturas e as distribuições de frequências dos ensaios efectuados pela metodologia RSM. A sequência dos ensaios da matriz de inulina com as respectivas concentrações de SS e temperaturas de secagens encontram-se no ponto 2.2 (ver quadro 11 do ponto 2.2).

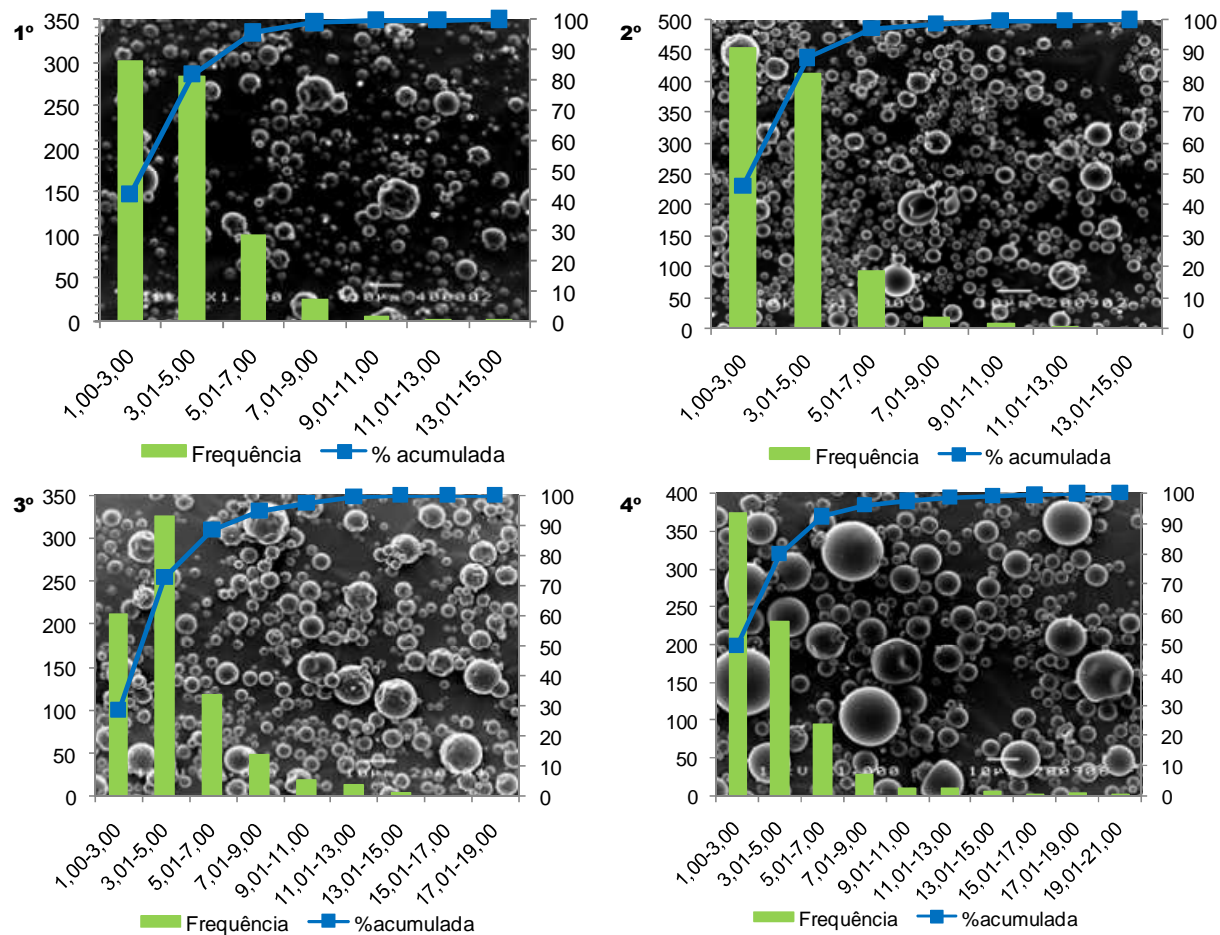


Figura 20 – Microestruturas e distribuições de frequências do 1º ao 4º ensaio da matriz de inulina.

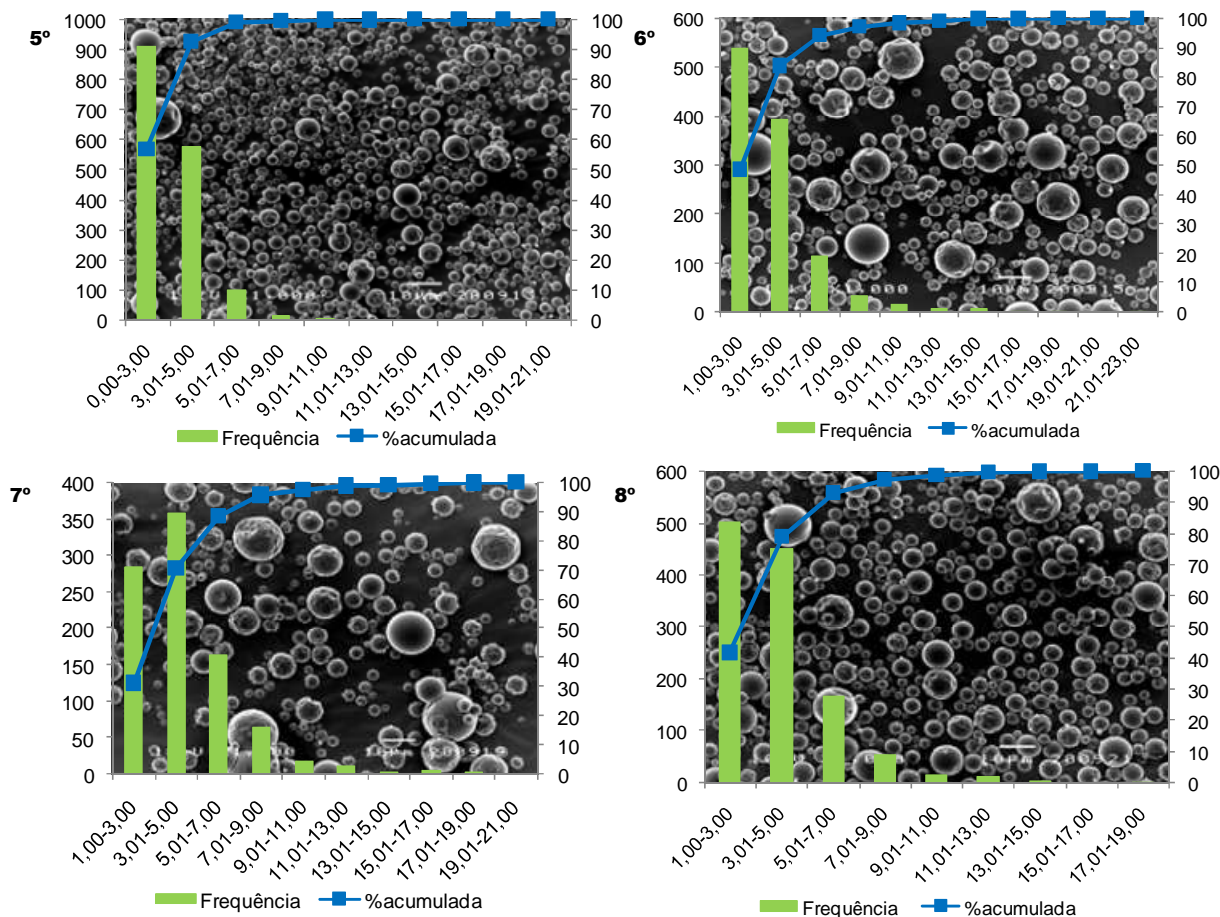


Figura 21 – Microestruturas e distribuições de frequências do 5º ao 8º ensaio da matriz de inulina.

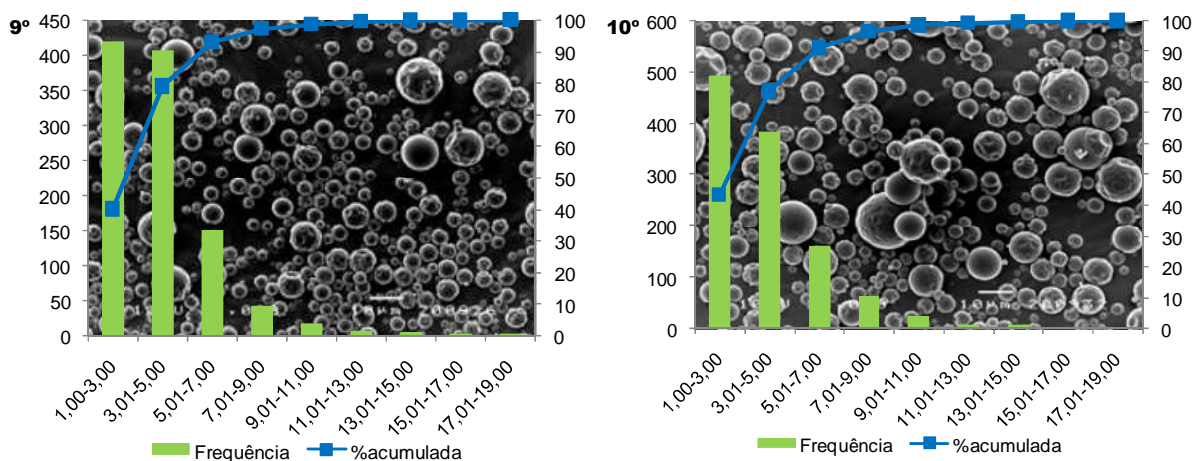


Figura 22 – Microestruturas e distribuições de frequências do 9º e 10º ensaio da matriz de RSM.

Pela análise das distribuições de frequência acima representadas, observou-se que os diâmetros médios de partícula variam entre 3,08 e 4,42 μm . Em comparação com os ensaios anteriores (preliminares), o diâmetro médio não variou muito, mas em termos de superfície de partícula observou-se uma melhoria bastante significativa. As microcápsulas tornaram-se mais lisas e perfeitamente esféricas, no entanto com algumas variações entre cada um dos ensaios.

Se compararmos por exemplo o 3º (classe dominante 3,01-5,00) com o 4º ensaio (classe dominante 1,00-3,00), estes foram efectuados com a mesma concentração de SS mas com temperaturas de secagem diferentes. Verificou-se que quando a temperatura aumenta a superfície das partículas melhora consideravelmente, no entanto o diâmetro médio diminui. Embora se verifique que no 4º ensaio existem algumas partículas de maiores dimensões, estas não são representativas. As imagens obtidas por MEV (anexo 3.1) permitem concluir que para temperaturas de secagem mais elevadas, a superfície das microcápsulas melhora, independentemente da concentração de SS utilizada (Figura A/B e E/F no anexo 3.1). Estas conclusões vêm ao encontro aos estudos efectuados por outros autores (Toneli *et al.*, 2008; Nogueira, 2001; Ré, 1998; Leite *et al.*, 2002).

A partir do teste t ilustrado no Quadro 15, verificou-se que a variação do diâmetro de partícula, com 99% de significância, é significativamente influenciado pelas duas variáveis (na forma linear e na quadrática), pois os respectivos *p-values* são inferiores ao nível de significância considerado ($p < 0,01$). Ou seja, tanto a concentração de SS como a temperatura de secagem têm efeitos significativos no diâmetro médio de partícula. A interacção entre as duas variáveis é pouco significativa ($p = 0,068741$).

Quadro 15 – Significância dos coeficientes de regressão do modelo obtido por RSM (utilizando a média aritmética como resposta).

Factor	Coef. Regressão	Erro padrão	t	p-value
Intercepção	10,55961	1,350734	7,8177	0,00001
Concentração de SS (L)	0,19959	0,031288	6,3793	0,00332
Concentração de SS (Q)	-0,00385	0,000686	-5,6155	0,004942
Temperatura (L)	-0,10291	0,017536	-5,8684	0,006316
Temperatura (Q)	0,00033	0,000056	5,8823	0,004175
Interracção	-0,00037	0,00015	-2,4728	0,068741

ANOVA: R=0,970; R ajustado=0,932; SS total=1,464262; SS residual=0,043864; MS residual=0,010966 (A tabela ANOVA encontra-se no anexo 3.2).

A análise efectuada permite concluir que diâmetro médio de partícula é significativamente afectado por ambas as variáveis (concentração de SS e temperatura de secagem), e o coeficiente de correlação é elevado (0,970).

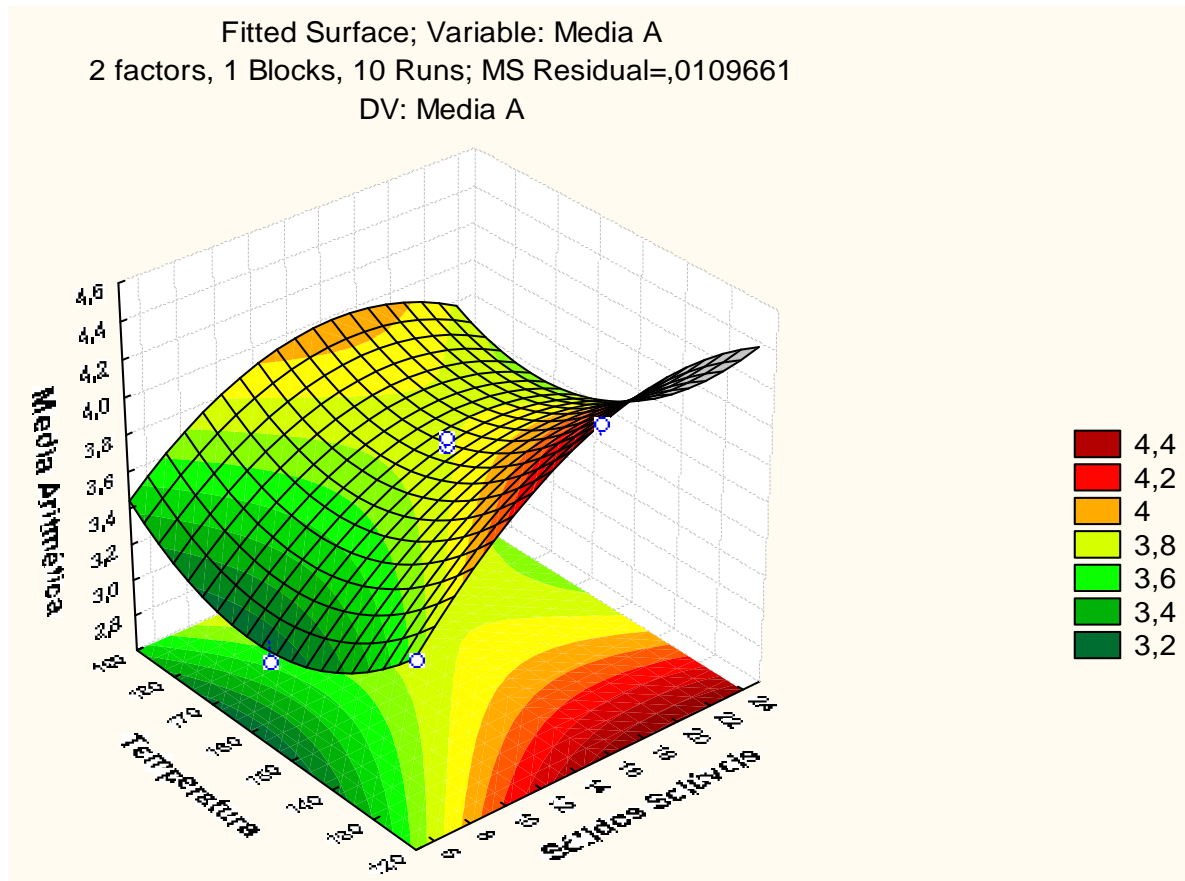


Figura 23 – Superfície de resposta para o modelo do diâmetro médio de partícula (variável dependente), em função das variáveis independentes (concentração de sólidos solúveis e temperatura de secagem) da matriz de inulina.

Pela superfície de resposta (Figura 23) observa-se diâmetros acima dos 4 μm para concentrações acima dos 10% de SS. O maior diâmetro alcançado de 4,4 μm . A variável que apresenta maior influencia sobre o diâmetro é a concentração de SS, embora estatisticamente se conclua que ambas as variáveis têm influência significativa.

A variação do diâmetro médio de partícula em função das duas variáveis é descrita pela equação (1):

$$Y = 10,559 + 0,199 \cdot X_1 - 0,004 \cdot X_1^2 - 0,103 \cdot X_2 + 0,000032 \cdot X_2^2 - 0,000369 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (1),$$

onde X_1 = sólidos solúveis e X_2 = temperatura de secagem.

Pela equação do gráfico verifica-se que a concentração de SS é directamente proporcional enquanto a temperatura é inversamente proporcional ao diâmetro.

Se considerarmos os diâmetros medianos (pela mediana) ou ponderados (média ponderada) em vez dos médios, as conclusões finais são semelhantes (ver anexo 3.3).

No entanto, as variações observadas nos diâmetros de partícula poderão não ser relevantes em posteriores estudos de encapsulamento, visto as cápsulas obtidas serem de muito reduzida dimensão. Por outro lado, as características da parede das cápsulas poderão sim ter influência significativa na eficiência do processo de encapsulamento.

4.3. Encapsulamento de óleo de orégão em matriz de inulina

4.3.1. Verificação dos encapsulados por Microscopia Confocal de Fluorescência

A análise e verificação dos encapsulados de inulina com o óleo essencial de orégão foram efectuadas através da técnica de Microscopia Confocal de Fluorescência.

A observação dos encapsulados por esta técnica teve como objectivo verificar de que forma o óleo se encontrava disposto nas microcápsulas de inulina. A amostra utilizada foi constituída por 15% de inulina, 2,25% de óleo de orégão e resultou da atomização no spray dryer a 120°C.

Na Figura 24 estão reunidas as imagens obtidas por esta técnica para a amostra analisada.

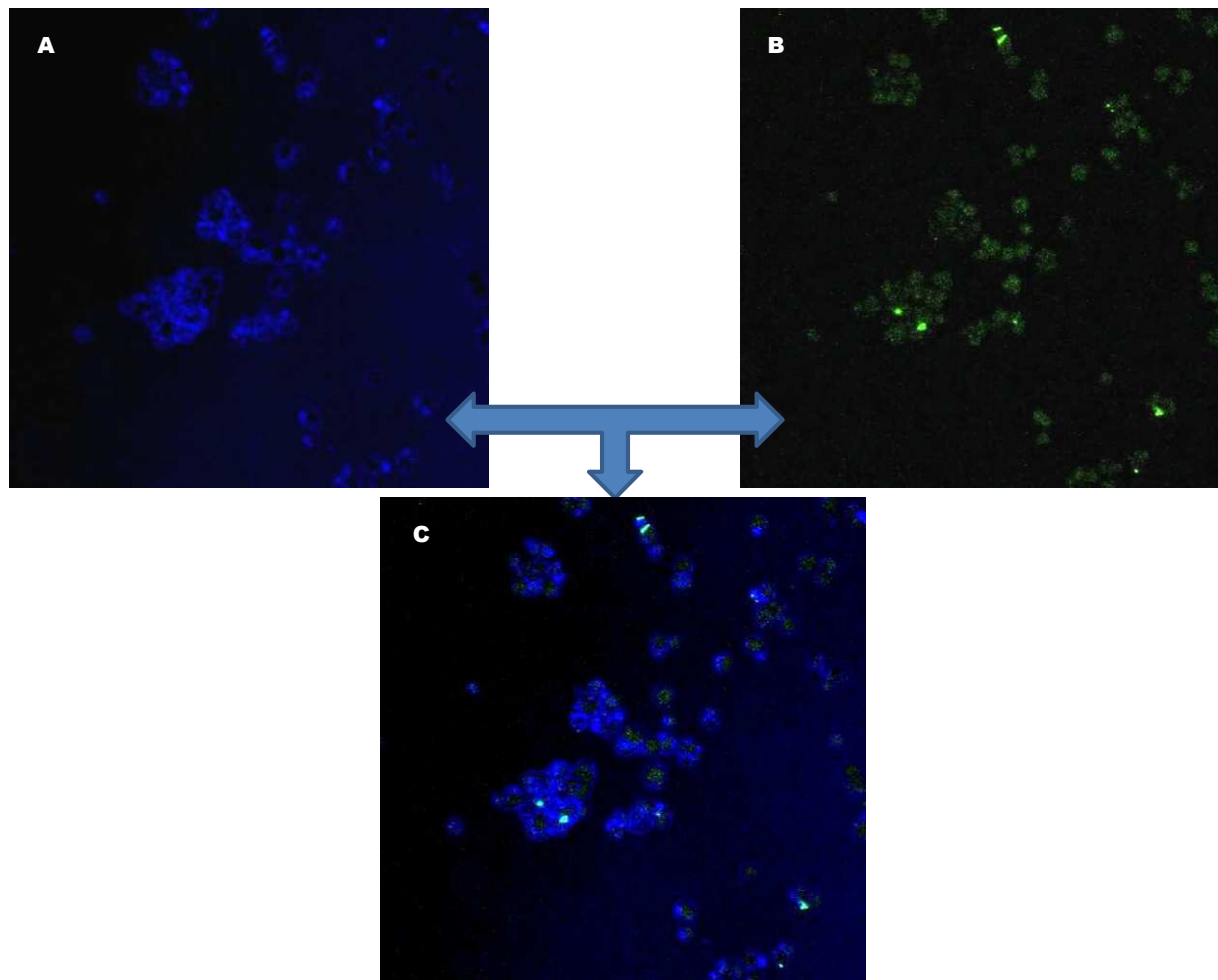


Figura 24 – Imagens captadas digitalmente por microscopia confocal dos encapsulados de inulina com óleo de orégão: A – Microcápsulas de inulina que emitem fluorescência azul no espectro visível; B – Óleo de orégão (devido à adição do β -caroteno) e inulina com fluorescência verde no espectro visível C – Sobreposição das duas imagens anteriores (partículas de inulina com óleo de orégão no seu interior).

Pela observação das imagens verifica-se que a inulina apresentou auto-fluorescência. Na imagem (A) consegue-se observar alguns conjuntos de microcápsulas de inulina aglomeradas entre si. A aglomeração é uma característica particular de substâncias ou materiais amorfos (que é o caso da inulina). Na imagem (B), observa-se que o óleo se dispõe predominantemente no interior das diversas microcápsulas, e que existem apenas pequenas fracções pontuais de óleo no exterior (pontos mais brilhantes da imagem). Ao sobrepor as duas imagens (C) visualiza-se as microcápsulas de inulina com óleo no seu interior. Deste modo conclui-se que a inulina funcionou eficazmente como agente encapsulante. Estes resultados vêm ao encontro da pesquisa bibliográfica (ver ponto 4.5 da revisão bibliográfica – Figura 12 (Madene, 2007)). Contudo, esta técnica de microscopia não

é por si só suficiente para concluir se o encapsulamento foi eficaz, pelo que será necessário utilizar técnicas específicas de avaliação da libertação controlada, nomeadamente técnicas como o NIR⁴ e o FTIR⁵.

4.3.2. Verificação e avaliação da microestrutura dos encapsulados por MEV

Pela observação das imagens obtidas por microscopia electrónica de varrimento (MEV) da matriz de inulina com óleo (Figura 25 e Figura 26) verificou-se a formação de encapsulados. No entanto, para além destes encapsulados observa-se muitas estruturas irregulares, semelhantes a vesículas.

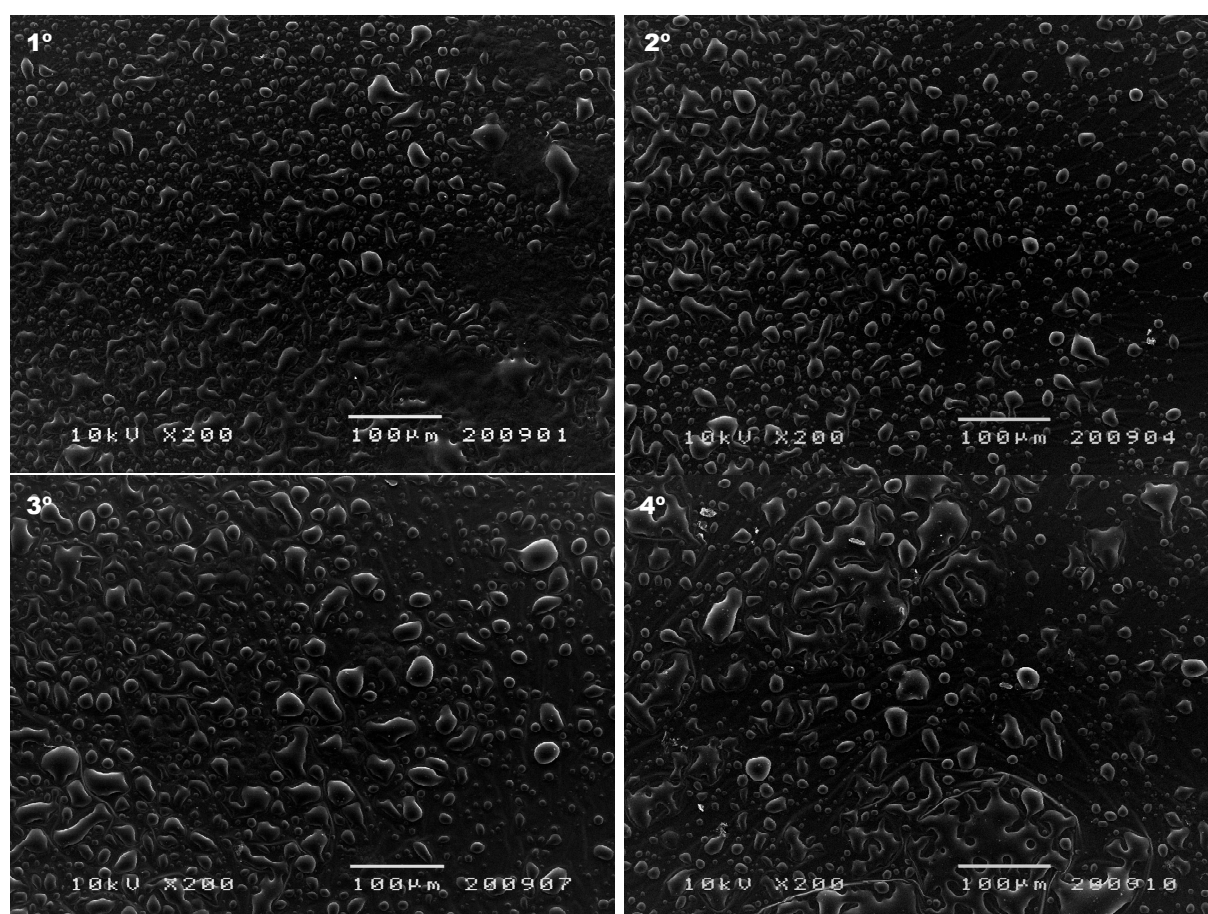


Figura 25 – Microestrutura dos encapsulados de inulina com óleo de orégão (1°, 2°, 3° e 4° ensaios da matriz - MEV, ampliação 200X).

⁴ Near Infrared Spectroscopy

⁵ Fourier Transform Infrared Spectroscopy

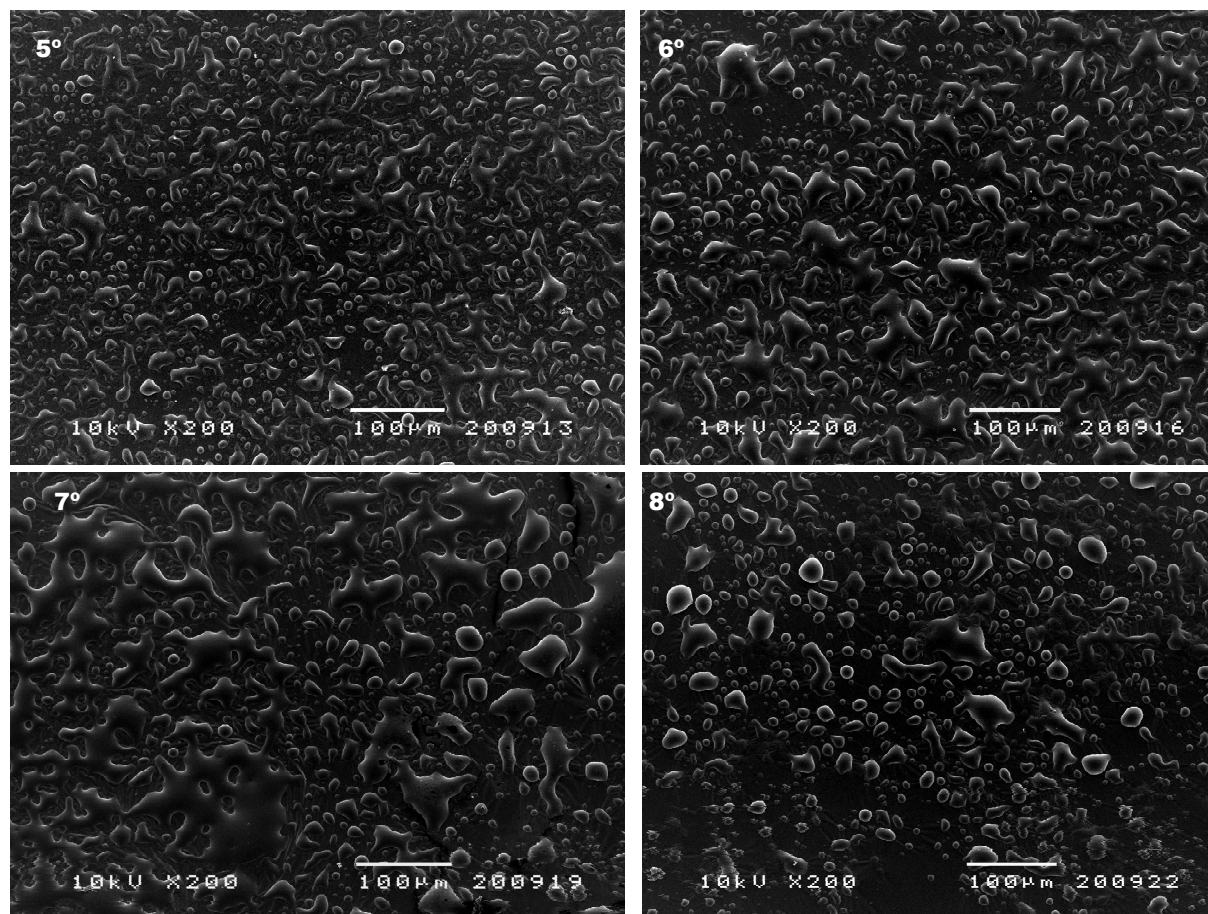


Figura 26 – Microestrutura dos encapsulados de inulina com óleo (5º, 6º, 7º e 8º ensaios da matriz - MEV, ampliação 200X).

Ao observar-se as imagens obtidas por MEV, verifica-se que com o aumento da temperatura diminuem as estruturas irregulares, ou seja, observa-se maior número de encapsulados esféricos. Esta tendência é mais nítida quando se compara o 1º com o 2º ensaio e o 7º com o 8º ensaio.

Tentando relacionar estas imagens com as condições de obtenção dos diferentes ensaios da matriz, poderão ser levantadas algumas hipóteses explicativas para a formação destas estruturas irregulares de maiores dimensões:

- A agitação pelo homogeneizador ultra-turrax poderá não ter sido eficiente para que a emulsão permaneça estável durante todo o processo de secagem, mantendo as pequenas gotículas de óleo individualizadas. Inicialmente a emulsão manteve-se estável, mas com o decorrer do processo de secagem verificou-se a separação das duas fases (fase contínua (solução aquosa com inulina) e fase dispersa (óleo)). As gotículas de óleo de menor dimensão apresentam uma maior área superficial específica relativamente às de maior diâmetro, e por conseguinte as de menor dimensão tendem a coalescer (coalescência).
- A parede do material encapsulante (inulina) apresenta uma espessura bastante fina, não sendo por isso suficientemente consistente para modular o óleo dentro das microcápsulas. Assim, durante o processo de secagem e formação dos encapsulados, o óleo ao ser pulverizado sob a câmara de secagem e em contacto com o ar quente, confere-lhes a forma com que se encontra em emulsão.
- Quanto mais baixa for a temperatura de secagem, mais lentamente se forma a membrana envolvente. Assim, nos ensaios onde se utilizaram temperaturas mais baixas (120° ou 155°C) verificou-se uma maior formação destas estruturas irregulares, ao contrário do que se observou para 190°C (sobretudo no 2° e 8° ensaios, em que era menor a quantidade de óleo relativamente ao 4° ensaio, também a esta temperatura mas com maior quantidade de óleo).

A Figura 27 corresponde a dois dos três pontos centrais da matriz de inulina com óleo (15% inulina, 2,25% óleo, a 155°C). Estas imagens ilustram em pormenor a coalescência das partículas menores às de maior dimensão, que embora observado em maior ou menor grau em todos os ensaios, aqui é melhor evidenciado devido à maior ampliação.

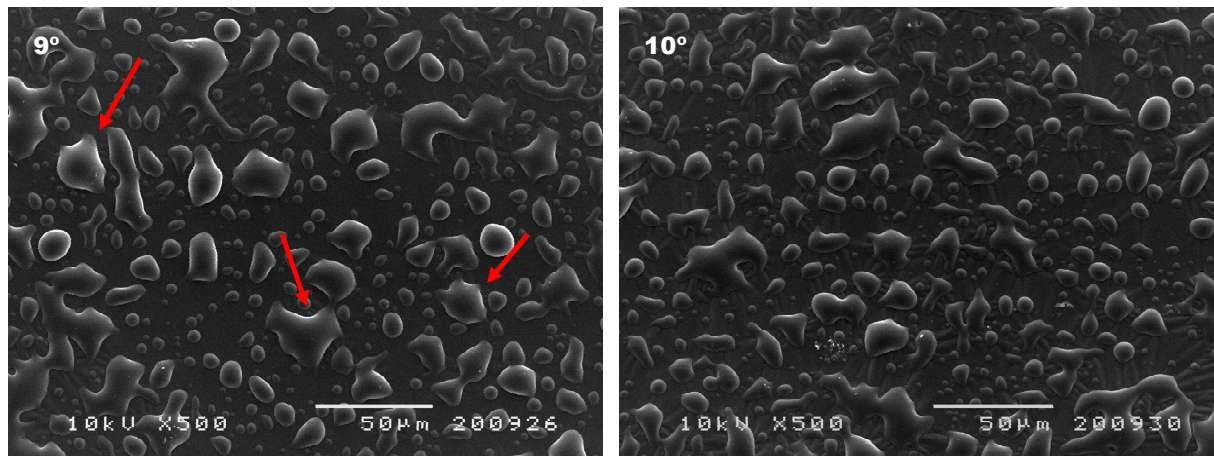


Figura 27 – Microestrutura dos encapsulados de inulina com óleo (9° e 10° ensaios da matriz - MEV, ampliação 500X).

De acordo com a pesquisa bibliográfica, as partículas resultantes do encapsulamento de óleos essenciais por atomização são geralmente do tipo microesfera. Nestas, o material bioactivo (óleo) encontra-se distribuído sob a forma de gotículas no interior da matriz que constitui o material encapsulante. O que foi observado nas imagens obtidas por microscopia confocal parece ir ao encontro desta “teoria”.

Para a obtenção do diâmetro médio das partículas consideraram-se apenas os encapsulados de forma esférica ou quase esférica. Neste último caso, o diâmetro dos encapsulados foi calculado através da média de dois diâmetros (maior e menor), de acordo com a Figura 28.

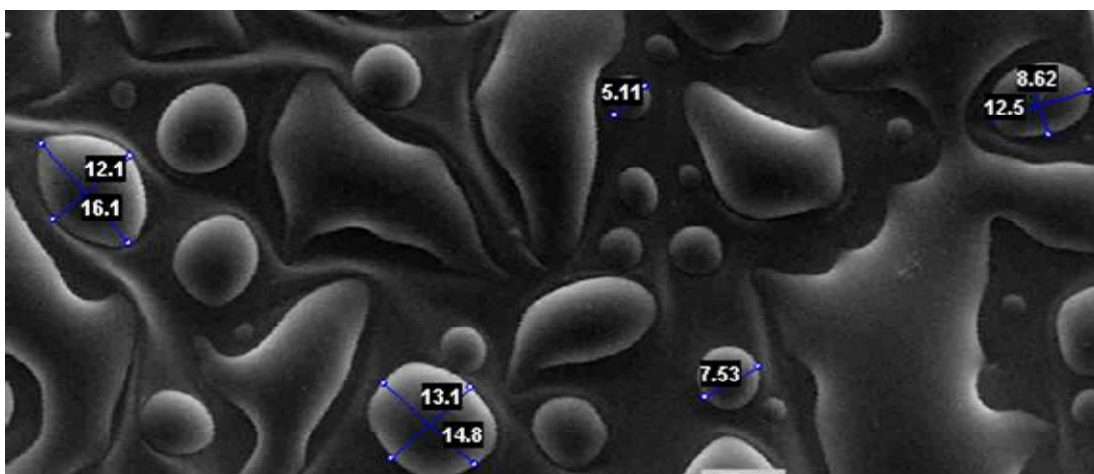


Figura 28 – Ilustração da medição dos diâmetros médios.

Através da elaboração das distribuições de frequências (Figura 29 e Figura 30) e comparando com os ensaios anteriores, verificou-se que o diâmetro médio das microcápsulas de inulina aumentou cerca de 50%. Este aumento foi consequência do preenchimento do espaço vazio das microcápsulas pelo óleo.

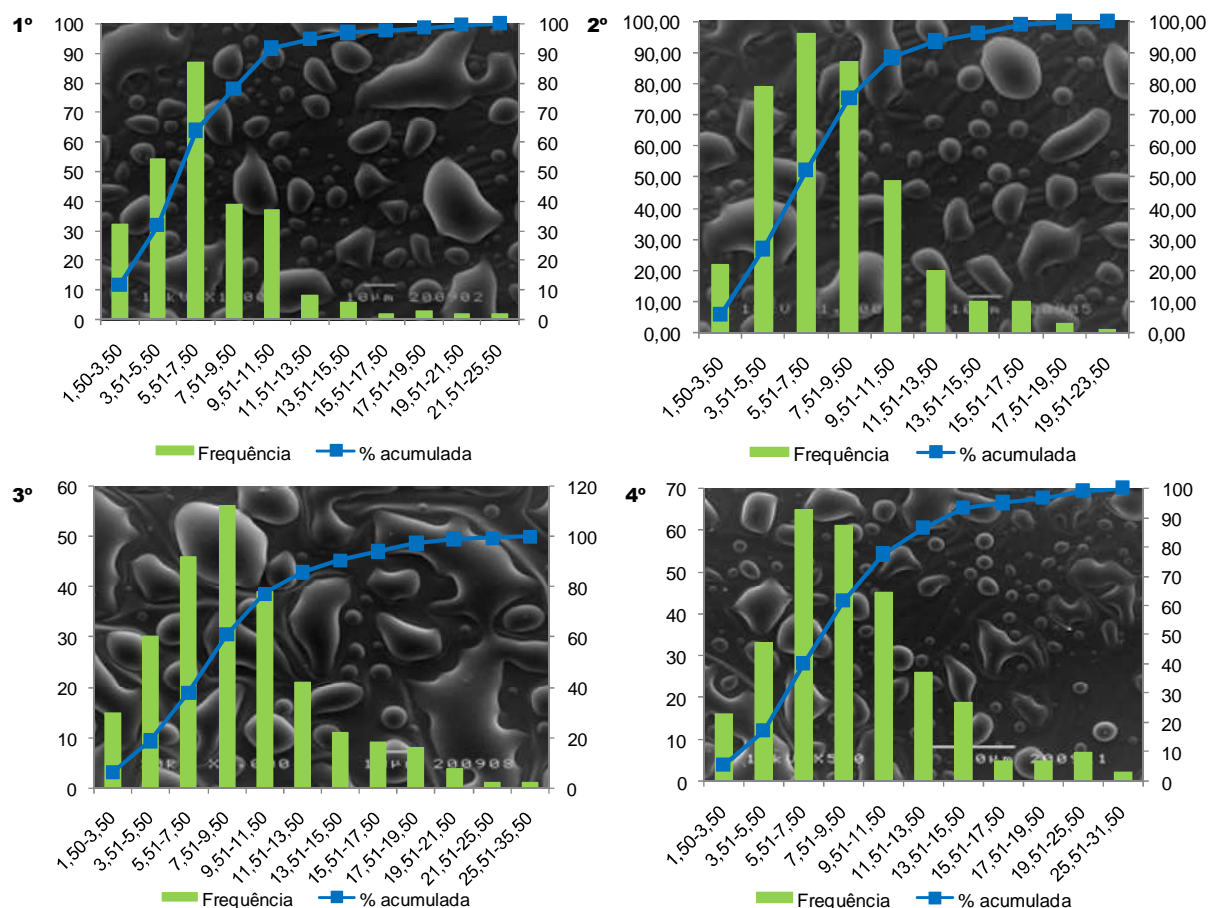


Figura 29 – Microestruturas e distribuições de frequências do 1º ao 4º ensaio da matriz de inulina com óleo.

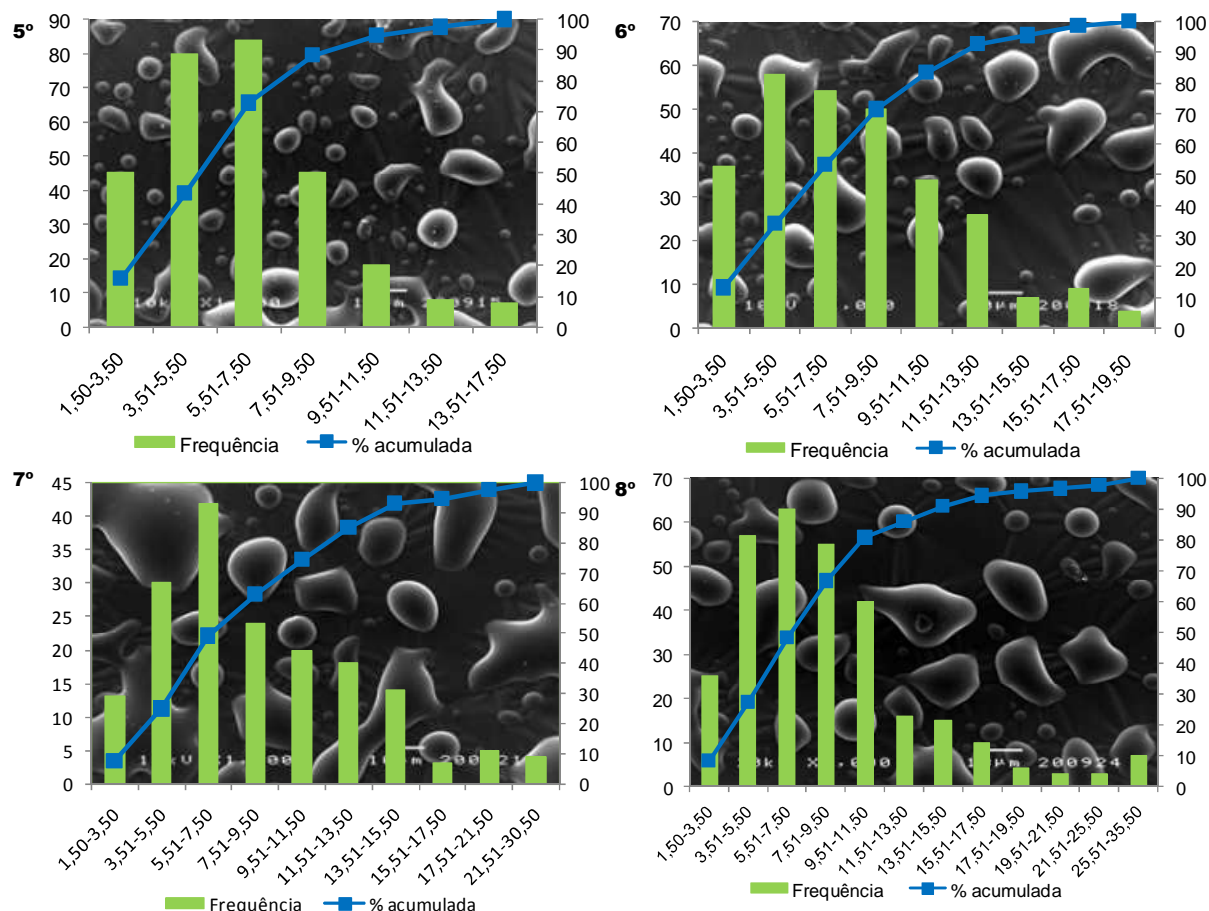


Figura 30 – Microestruturas e distribuições de frequências do 5º ao 8º ensaio da matriz de inulina com óleo.

No Quadro 16 reúne-se a informação relativa aos diâmetros médios de partícula obtidos para a matriz de inulina com e sem óleo, de forma a evidenciar o aumento significativo do diâmetro médio na matriz de inulina com óleo (variando entre 6,30 e 9,24 μm).

Quadro 16 – Comparação dos diâmetros médios das microcápsulas para as duas matrizes elaboradas.

Ensaio	% SS	T (°C)	Diâmetro médio (inulina)	Diâmetro (inulina+óleo)
1º	5	120	3,62	7,23
2º	5	190	3,51	7,82
3º	25	120	4,42	9,24
4º	25	190	3,79	9,12
5º	5	155	3,08	6,30
6º	25	155	3,60	7,64
7º	15	120	4,42	8,86
8º	15	190	3,83	8,72
9º	15	155	3,83	6,69
10º	15	155	3,87	6,51

Em termos de superfície de partícula todos os encapsulados apresentam superfícies lisas, o que indica que têm o seu espaço interior completamente preenchido com o óleo.

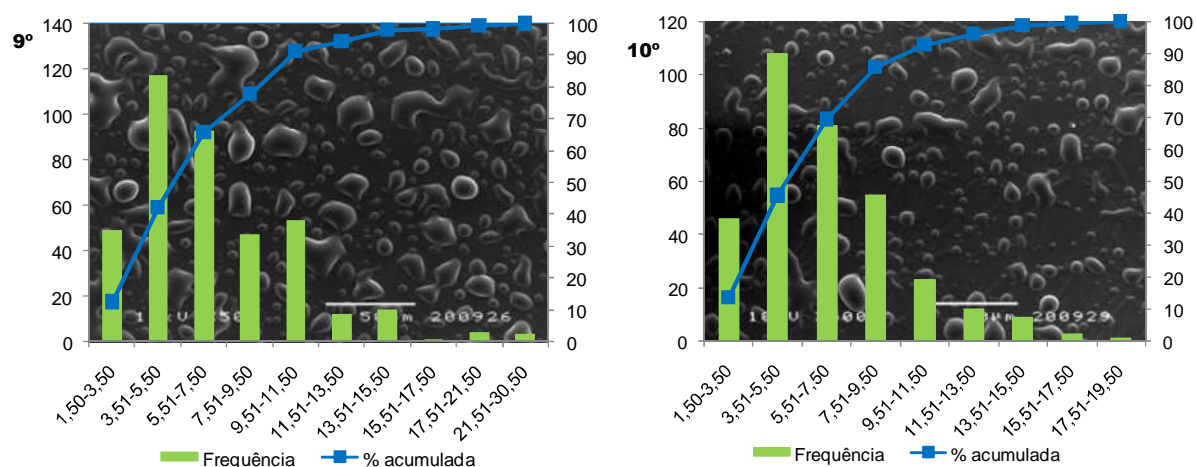


Figura 31 – Microestruturas e distribuições de frequências dos pontos centrais da matriz (9º e 10º ensaios).

Através do teste t ilustrado no Quadro 17, verificou-se que a variação do diâmetro médio dos encapsulados, com 99% de significância, é influenciado unicamente pela temperatura de secagem (na forma linear e na quadrática), pois os respectivos *p-values* são inferiores ao nível de significância considerado ($p < 0,01$). Contrariamente ao que aconteceu nos ensaios de optimização das condições de secagem, a concentração de SS não tem influência significativa no diâmetro de partícula dos encapsulados. A interação entre as duas variáveis também não apresenta qualquer influência no diâmetro ($p = 0,358301$).

A análise estatística permite concluir que a variável que apresenta maior influência sobre o diâmetro médio é a temperatura de secagem. O coeficiente de correlação ($R = 0,958$) deduz um bom ajuste do modelo.

Quadro 17 – Significância dos coeficientes de regressão do modelo obtido por RSM (utilizando a média aritmética como resposta).

Factor	Efeito	Erro padrão	t	p
Intercepção	37,94099	4,415561	8,59256	0,001008
Concentração de SS (L)	0,18354	0,102280	1,79444	0,147188
Concentração de SS (Q)	-0,00091	0,002241	-0,40797	0,704189
Temperatura (L)	-0,42826	0,057324	-7,47076	0,001716
Temperatura(Q)	0,00141	0,000183	7,71318	0,001521
Interacção	-0,00051	0,000489	-1,03702	0,358301

Nota: $R = 0,958$; R ajustado = 0,906.

Apesar do teste t concluir que a única variável com influencia significativa no diâmetro médio é a temperatura de secagem, pelo teste ANOVA verifica-se que ambas as variáveis têm influencia. Observa-se que a concentração de SS tem influência significativa apenas na forma linear, enquanto a temperatura tem influência significativa na forma quadrática (seja qual for o nível de significância considerado: 0,01 ou 0,05).

Quadro 18 – Tabela resumo da ANOVA a dois factores (concentração de sólidos solúveis com três níveis; temperatura de secagem com 3 níveis), utilizando a média aritmética como resposta.

Factor	SQ	g.l.	QM	F	p-value
Concentração de SS (L)	3,60375	1	3,603750	30,75177	0,005172
Concentração de SS (Q)	0,01950	1	0,019505	0,16644	0,704189
Temperatura (L)	0,01815	1	0,018150	0,15488	0,713992
Temperatura (Q)	6,97190	1	6,971905	59,49313	0,001521
Interacção	0,12603	1	0,126025	1,07541	0,358301
Resíduos	0,46875	4	0,117188		
Total	11,28141	9			

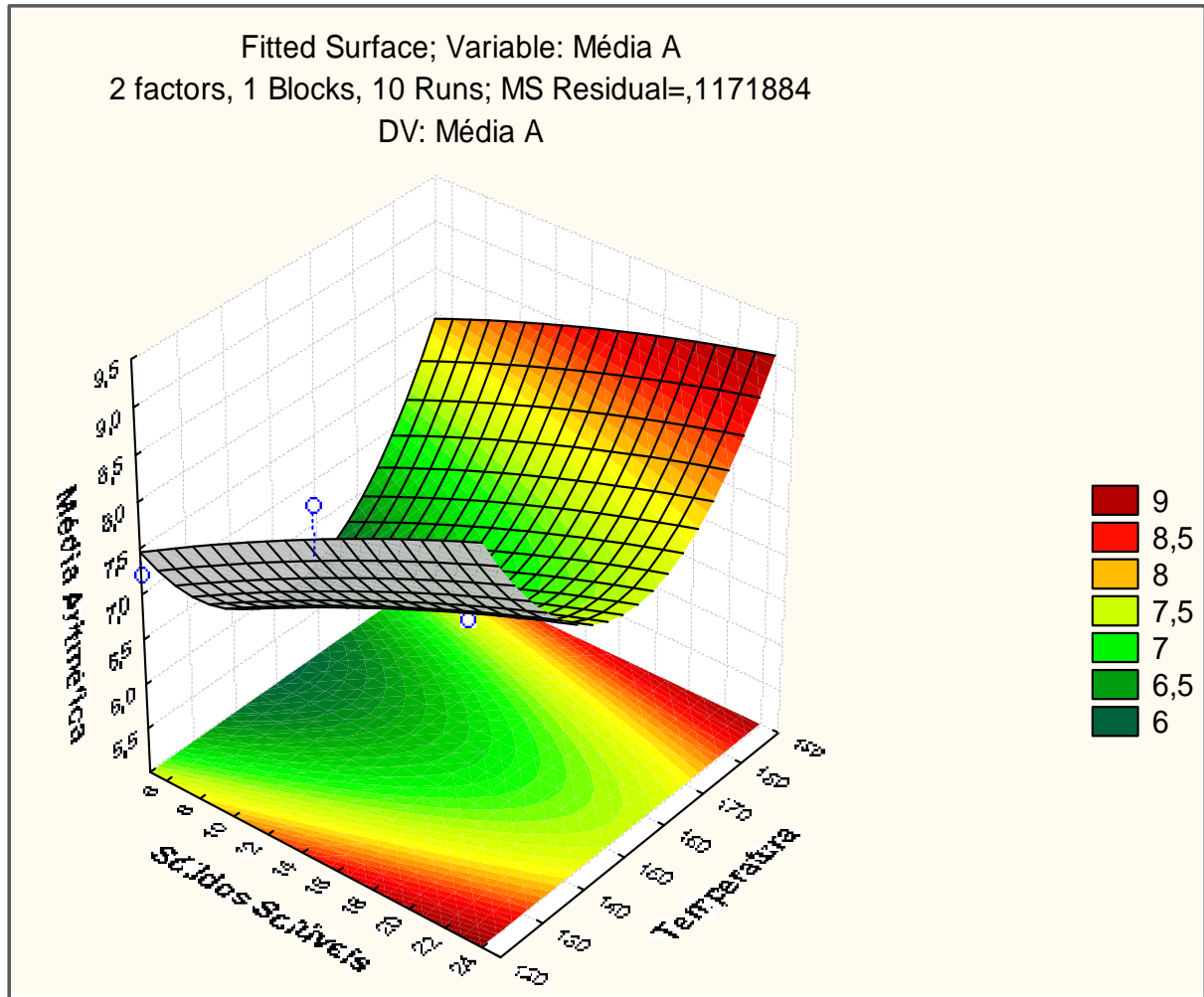


Figura 32 – Superfície de resposta para o modelo do diâmetro médio de partícula (variável dependente), em função das variáveis independentes (concentração de sólidos solúveis e temperatura de secagem), da matriz de inulina com óleo.

Pela superfície de resposta confirma-se que temperatura de secagem é a variável que apresenta maior influência no diâmetro médio. No entanto, verifica-se que para concentrações elevadas de SS podem ocorrer encapsulados com diâmetros superiores a 9 μm . Relativamente a temperaturas intermédias os diâmetros médios são da ordem dos 6-7 μm .

A variação do diâmetro médio de partícula em função das duas variáveis é descrita pela equação (2):

$$Y = 37,941 + 0,183 \cdot X_1 - 0,0009 \cdot X_1^2 - 0,428 \cdot X_2 + 0,001 \cdot X_2^2 - 0,0005 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (2),$$

onde X_1 = sólidos solúveis e X_2 = temperatura de secagem.

Pela observação do gráfico pode concluir-se ainda que em condições extremas de temperatura (120°C e 190°C) se observa um efeito mais acentuado da concentração de SS. Este efeito é bastante perceptível quando se roda o gráfico para a direita e no sentido horizontal (Figura 33).

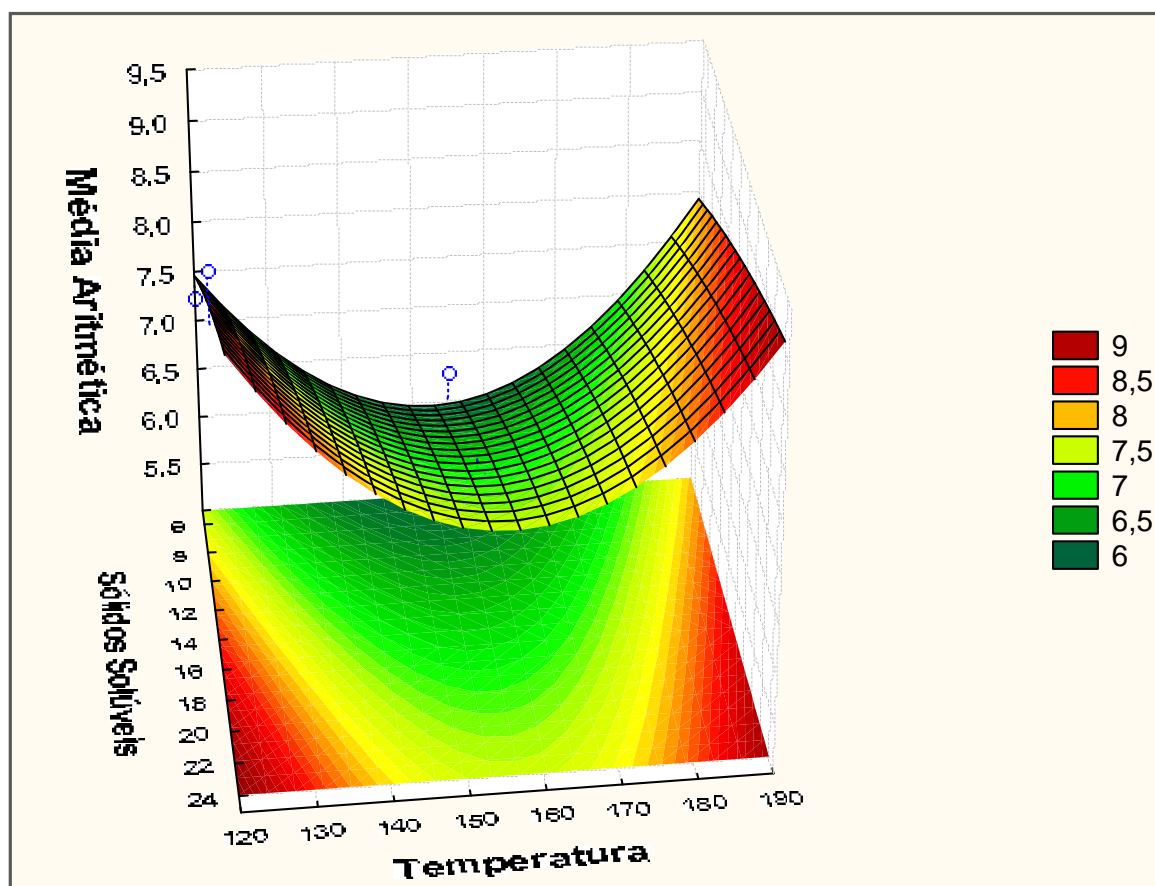


Figura 33 – Superfície de resposta da matriz de inulina com óleo (com rotação para a direita na horizontal).

III – CONCLUSÕES

A primeira conclusão a que se pode chegar é que o processo de liofilização conduz à formação de estruturas bastante diferentes das que se obtiveram por atomização, ou seja, não se verificou a estrutura esférica das partículas observada nos ensaios obtidos por atomização.

Para se poder relacionar o GP com o diâmetro médio de partícula, é necessário partir-se de amostras obtidas pelo mesmo processo. O processo de obtenção industrial das amostras comerciais é diferente do laboratorial e por conseguinte, não podemos relacionar amostras diferentes, portanto as comerciais estão sujeitas a temperaturas de secagens muito mais elevadas do que as obtidas por liofilização. Ou seja, os extractos de inulina obtidos no laboratório partiram de uma amostra de raízes de chicória liofilizadas, sendo este um processo que mantém inalteradas as características da matéria-prima. Assim, verificou-se que as amostras comerciais de inulina (e não apenas FOS) apresentavam um diâmetro médio de partícula inferior ao do extracto de inulina total obtido no laboratório.

Comparando as amostras comerciais (Fibrulose, Raftiline e Baneo) nos ensaios preliminares, constatou-se que existe uma tendência para a diminuição do diâmetro médio quando o GP aumenta. O mesmo acontece quando comparamos, entre si, os dois tipos de extractos laboratoriais de inulina.

Nos ensaios de optimização das condições de formação das microcápsulas de inulina, concluiu-se que ao aumentar a concentração de sólidos solúveis, mantendo a mesma temperatura de secagem, o diâmetro médio aumenta. Mas se aumentar a temperatura mantendo a mesma concentração, o diâmetro médio diminui, sendo esta diminuição mais acentuada para a concentração mais elevada (25%). O diâmetro das partículas obtidas variou entre 3,08 e 4,2 μm .

Para além da temperatura de secagem ter influência no diâmetro (quanto mais elevada for menor é o diâmetro), tem também influência na superfície das partículas (quanto mais elevada, mais lisa e homogénea é a superfície). Assim, a concentração de sólidos é directamente proporcional ao diâmetro de partícula e a temperatura de secagem é inversamente proporcional.

Tanto para os ensaios preliminares como para ensaios de otimização das condições de secagem, verificou-se que as microcápsulas de inulina de menores dimensões se dispunham em redor das de maiores dimensões. Esta particularidade é comum para substâncias ou materiais amorfos, como é o caso da inulina.

Relativamente aos ensaios de encapsulamento, pela técnica de microscopia confocal de fluorescência verificou-se a formação de microencapsulados de inulina com óleo de orégão, com as gotículas de óleo dispersas no interior das microesferas de inulina. O que permite concluir que a inulina é um potencial agente de encapsulante, pois formou encapsulados de óleo sem qualquer adição de emulsionantes. De acordo com a pesquisa bibliográfica, a inulina possui praticamente todos os requisitos necessários para ser considerado um agente encapsulante eficiente.

A análise estatística pelo teste t concluiu que a variável com maior influência no diâmetro médio dos encapsulados é a temperatura de secagem. Contudo, pelo teste ANOVA verificou-se que ambas as variáveis têm influência. Assim, os resultados obtidos nos ensaios de encapsulamento são semelhantes aos obtidos na otimização das condições de secagem. Os encapsulados obtidos apresentaram diâmetros entre 6,30 e 9,24 μm .

Nestes ensaios observou-se diâmetros maiores nas condições extremas de temperatura e de concentração de SS. Ou seja, para temperaturas extremas (120° e 190°C) à medida que a concentração aumenta observa-se diâmetros maiores. Assim, a concentração é directamente proporcional ao diâmetro. Para temperaturas intermédias observa-se diâmetros menores, no entanto superiores aos registados nos ensaios anteriores.

Na elaboração das matrizes de inulina com e sem óleo, verificou-se que ambas as variáveis têm influencia no diâmetro médio de partícula.

O estudo da inulina como potencial agente encapsulante de compostos bioactivos, permitiu analisar a sua microestrutura e identificar as condições de obtenção dos encapsulados que conduziam a melhores resultados. Contudo, este estudo baseou-se unicamente nas características estruturais e morfológicas. Para que fique completo o estudo de encapsulamento, são necessárias técnicas de avaliação de libertação controlada, técnicas estas que não foram possíveis de concretizar em tempo útil.

IV – REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Abrams, S. A., Griffin, I. J., Hawthorne, K. M., & Ellis, K. J. 2007. Effects of prebiotic supplementation and calcium intake on body mass index. *J. Pediatr.*, 151: 293-298 (Citado por: Saulnier *et al.*, 2009).
- Barbosa-Canovas, G. V., & Nega-Mercado, H. 1996. *Dehydration of Foods*. New York, NY: Chaman & Hall (Citado por: Madene *et al.*, 2006).
- Belval, H. 1927. Industrie de l'inuline et du lévulose (book): "*Dix ans d'efforts scientifiques industriels et coloniaux 1914-1924*". Chimie et Industrie, Paris, p. 1068-1069 (Citado por: Orafti, 1996)
- Bernier, J. J., & Pascal, G. 1990. Valeur Energétique des polyols (Sucres-alcools). *Méd. et Nut.*, 26: 231-238 (Citado por: Orafti, 1996).
- Bertolini, A. C., Siani, A. C., & Grosso, C. R. F. 2001. Stability of monoterpenes encapsulated in gum arabic by spray-drying. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49: 790-785 (Citado por: Gharsallaoui *et al.*, 2007).
- Bimbenet, J. J., Bonazzi, C., Dumoulin, E. 2002. Drying of foodstuffs. Drying'2002 . In: *Proceeding of the 13th international drying symposium*, p.64-80 (Citado por: Gharsallaoui *et al.* 2007).
- Boswell, 1979. Endive and Chicory. In: Ryder, E. J. *Leafy salads vegetables*. Chap 5:. Westport, Connecticut. Avi Publishing Company, Inc..p. 177-194.
- Bollinger, H. 2001. Consumer Expectations and Eating Behavior over Time. *Food Marketing & Technology*, 15 (5): 10-15.
- Brazel, C. S. 1999. Microencapsulation: offering solutions for the food industry. *Cereal Foods World*, 44: 388-393 (Citado por: Ribeiro, 2007).
- Brennan, J. G. 2006. *Food Processing Handbook*. Weinheim, Germany, Wiley–VCHVerlag p.105-110.
- Cashman, K. 2002. Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. *Brazilian Journal of Nutrition*, 87: 169-177 (Citado por: Roberfroid, 2007).

Clark, J P. 2002. Food encapsulation capturing one substance by another. *Food Technology*, 56: 63-65 (Citado por: Ribeiro, 2007).

Corcoran, B. M, Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. 2004. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-drier in the presence of prebotic substances. *J. Appl. Microbiol.*, 96: 1024-1039 (Citado por: Ross, R. P., Desmond, C., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. 2005. A review: Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *J. Appl. Microbiol.*, 98: 1410-1417).

Crittenden, R., Weerakkody, R., Sanguansri, L., & Augustin. 2006. Sybiotic Microcapsules That Enhance Microbial Viability during Non-refrigerated Storage and Gastrointestinal Transit. *Applied and Environmental Microbiology*, 3: 2280-2282.

Cummings, J. H., Englyst, H., & Kigman, S. M. 1992. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal Clinic Nutrition*, 46: 33-50 (Citado por: Cummings, J. H. 1997).

Cummings, J. H. 1997. The large intestine in nutrition and disease. *Institute Danone*, p.161.

Delzenne, N. M., Daubioul, C., Neyrinck, M., Lasa, M., & Taper, HS. 2002. Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: Review of biochemical events and future prospects. *Brazilian Journal of Nutrition*, 87(2): 255-259 (Citado por: Roberfroid, 2007).

Den Hond, E. M., Geypens, B. J., & Ghooos, Y. F. 2000. Effect of long chain chicory inulin on bowel habit and transit time in constipated persons. *Nutrition Res*, 20: 731-736 (Citado por: Roberfroid, 2007).

Desai, G. K. H., & Park, H. J. 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients, 23: 1361-1394 (Citado por: Duarte, 2005).

Desobry, S. A., Netto, F. M., & Labuza, T. B. 1997. Comparison of spray-drying, drum drying and freeze-drying for (1→ 3, 1→ 4)-β-carotene encapsulation and preservation. *Journal of Food Science*, 62:1158-1162 (Citado por: Madene *et al.*, 2006; Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Dhellemmens, C. H. 1987. Agronomy of Chicory. In: Clarke, R. J. e Macrae, R. (ed.). *Coffe, vol. 5, Related Beverages*, London, Elsevier, p.179-191.

Dobre, T., Stroescu, M., Stoica, A., Draghici, E., & Antohe, N. 2008. Inulin Extraction and Encapsulation. *Cham. Bull. "POLITEHNICA"*, 53: 215-217.

- Drusch, S. 2006. Sugar beet pectin: A novel emulsifying wall component for microencapsulation of lipophilic food ingredients by spray-drying. *Food Hydrocolloids* (Citado por: Gharsallaoui *et al.* 2007).
- Dubernet, C., & Benoit, J. P. 1986. La microencapsulation: Ses techniques et ses applications en biologie. *L'actualité chimique*, Décembre: 19-28 (Citado por: Gharsallaoui *et al.* 2007).
- Dziezak, J. D. 1988. Microencapsulation and Encapsulated Ingredients. *Food Technology*, 42:136-151.
- Fairweather-Tait, S.J., & Johnson, I. T. 1999. Bioavailability of minerals (Citado por: Roberfroid, M. B. 2007).
- Flemming, R. S. 1921. The spray process of drying. *The Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 13: 447-449 (Citado por: Gharsallaoui *et al.* 2007).
- Frank, A. 2006. Inulin. In: Stephen, A. M., Phillips, G. O., & Williams, P. A. *Food Polysaccharides and Their Applications*. Second edition. Taylor & Francis Group, p. 335-349.
- Frankinet, M.; Notté, Ch.; Van Herck, J. C. 1996. Influence of crop management factors on inulin content of chicory. In: FUCHS. A. (ed.) *Proc. Sixth Seminar on Inulin*. Braunschweig, Germany, p.1-8.
- Fuller, R. 1992. History and development of probiotics. In: Fuller, R (ed.) *Probiotics*. The Scientific Basis, London, Chapman and Hall, p.1-8 (Citado por: Kailasapathy, 2002).
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. 2007. Applications of spray drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40:1107-1121.
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., & Mulligan, C. N. 1999. Encapsulation in the food industry: A review. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 50:213-224 (Citado por: Gharsallaoui *et al.* 2007).
- Gibson, G. R., & Kolida, S. 2007. Prebiotic Capacity of inulin-Type Fructans. *The Journal of Nutrition*, 137:2503S-2506S.

- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. 1994. Dietary Modulation of Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition*, p.1401-1412.
- Górecka, D., Lampart-Szczapa, Janitz, W., & Sokolowska, B. 2000. Composition of fractorial and functional properties of dietary fiber of lupines (*L. luteus* and *L. albus*). *Nahrung*, 44 (3): 229-232.
- Gouin, S. 2004. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 15: 330-347 (Citado por: Gharsallaoui *et al.* 2007).
- Hartman, G. H., Akeson, J. W. R., & Stahmann, M. A. 1967. Leaf protein concentrate prepared by spray-drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 15: 74-79 (Citado por: Gharsallaoui *et al.* 2007).
- Heinzelmann, K., & Franke, K. 1999. Using freezing and drying techniques of emulsions for the encapsulation of fish oil to improve oxidation stability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 12: 223-229 (Citado por: Madene *et al.* 2006).
- Hendry, G. A. F., & Wallace, R. K. 1993. The origins and natural functions of fructans – a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytol.*, 123: 3-14 (Citado por: Kaur & Gupta, 2002).
- Izydorczyk, M. 2005. In: Cui, S. W. *Food Carbohydrates – Chemistry, Physical properties, and Applications*. Taylor and Francis Group – CRC, p.30-33.
- Januário, M. I. 1999. A Chicória: Valorização industrial. Tese de Doutorado em Engenharia Agro-Industrial, Universidade Técnica de Lisboa, ISA.
- Jacquot, M., & Perneti, M. 2003. Spray coating and drying processes. In: *Cell Immobilization Biotechnology* (ed.) by U. Nedovic & Willaert), p. 343-356. Series: Focus on biotechnology. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers (Citado por Madene *et al.*, 2006).
- Kailasapathy, K. 2002. Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, 3: 39-48.
- Kaur, N., & Gupta, A. K. 2002. Applications of inulin oligofructose in health and nutrition. *J. Bioch.*, 27: 703-714.

Kawase, K., Suzuki, T., Kiyosawa-Watabe, A., Yalima, T., & Kuboyama, M. 1981. Effects of composition of infant's formulas on the intestinal microflora of infants. *Bifidobacteria Microflora*, 2: 25-31 (Citado por: Gibson, 1994).

King, C. J. 1984. Transport processes effecting food quality in spray drying: review paper. In: Mc Kenna, B. M. *Engineering and Food Vol. 2 - Processing Applications*. Dublin, Ireland, Elsevier Applied Science p.559–574

Leclerc, C. L., Champ, M., Boillot, J. 1984. *Am. J. Clin. Nut.*, 59: 914-921 (Citado por [9]).

Leite, J. T. C., Park, K. J., & Ramalho, J. R. P. 2002. Isotermas de adsorção e modelagem matemática da inulina em pó. In: *Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Porto Alegre (Citado por: Toneli, 2008).

Lomax, A. R., & Calder P. C. 2008. Prebiotics, Immune function, Infection and Inflammation: a review of the evidence. *Brazilian Journal of Nutrition*, p.1-28 (Citado por: Saulnier *et al.*, 2009).

Lui, X-D., Atarashi, T., Furuta, T., Yoshii, H., Aishima, S., Ohkawara, M., *et al.* 2001. Microencapsulation of emulsified hydrophobic flavours by spray-drying. *Drying Technology*, 19:1361-1374 (Citado por: Gharsallaoui *et al.* 2007).

Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. 2006. Flavour encapsulation and controlled release – A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 1-21.

Maier, H. G. 1987. Introduction. In: Clarke, R. J. e Macrae, R. (ed.). *Coffe, vol. 5, Related Beverages*, Chap: 1, London, Elsevier, p.1-18.

MushFegh, A. J., Friday, J. E., Goldman, J. P., & Chug Ahuga, J. K. 1999. Presence of inulin and oligofructose in the diets of Americans. *J. Nutrition*, 129: 1407-1414 (Citado por: Roberfroid, 2000).

Nagata, T. 1996. Techniques et application of electron microscopic radioautography. *Journal of Electron Microscopy*, 45: 258-274 (Citado por: Madene *et al.* 2006).

Nogueira, R. I. 2001. Processo de obtenção de inulina de chicória (*Cichorium intybus* L.) em pó. Tese de Doutorado em Engenharia Agrícola - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (Citado por: Toneli, 2008).

Oliveira, J. N. B. 1981. A beterraba sacarina, a chicória e o chá na ilha de São Miguel. Relat. Activid. Curso Eng. Agrónomo, Lisboa, ISA (Citado por: Januário, 1999).

Oliveira, A. R., Park, J. K., Chiorato, M., Park, B. J. K., & Nogueira, I. R. 2004. Optimização da Extracção de Inulina de Raízes de Chicória. *Revista Brasileira de Produtos Agro-industriais*, 6: 131-140.

Orafti 1996. *Raftilose & Raftiline – Product Book. Version 1*. Tienen. Orafti – Active Food Ingredients. p.127.

Park, K. J., Park, T. H. K. B., Park, K. J. B., & Nogueira, I. R. Processo de Obtenção de Concentrado de Inulina por Abaixamento de Temperatura. *Patente Brasileira número PI 0003867-9*, 17 de Agosto de 2000.

Pazola, Z. 1987. The Chemistry of Chicory and Chicory-product Beverages. In: Clarke, R. J. e Macrae, R. (ed.). *Coffe, vol. 5, Related Beverages*, London, Elsevier, p. 19-57.

Pool-Zobel, B. L., & Sauer, J. 2007. Overview of experimental data on reduction of colorectal cancer risk by inulin-type fructans. *The Journal of Nutrition*, 137: 2580-2584 (Citado por: Saulnier *et al.*, 2009).

Poulain, N., Dez, I., Perrio, C., Lasne, M. C., Prud'homme, M. P., & Nakache, E. 2003. Microspheres based on inulin for the controller release of serine protease inhibitors: preparation, characterization and in vitro release. *Journal of Controlled Release*, 92: 27-38.

Pszczola, D. E. 2002. Confectionery Ingredients Bridge Indulgence with Health. *Food Technology – Products and technologies*, 56 (9): 3.

Reinccius, G. A. 1988. Spray-drying of food flavors (Citado por: Saénz. *et al.* 2009).

Reis, F. M. 1999. *Utilização do Frio Alimentar*. Clássica Editor, p.55-56.

Ré, M. I. 1998. Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*, 16: 1195-1236.

Ribeiro, C. M. M. 2007. Encapsulamento de aromas alimentares – Estudo da eficiência de diferentes matrizes e tecnologias de encapsulamento. Tese de Doutoramento em Engenharia Agro-Industrial, Universidade Técnica de Lisboa, ISA.

Risch, S. J. 1995. Encapsulation: overview of uses and techniques (Citado por: Duarte, 2005).

- Roberfroid, M. B. 1999. Caloric value of inulin and oligofructose. *Journal of Nutrition*, 129: 1436-1443 (Citado por: Roberfroid, 2000).
- Roberfroid, M. B. 2000. Chicory Fructooligosaccharides and the Gastrointestinal Tract. *Nutrition*, 16: 677-679.
- Roberfroid, M. B. 2002. Functional food concept and its applications to prebiotics. *Digest Liver Dis.*, 34: 104-110.
- Roberfroid, M. B. 2007. Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients. *Journal of Nutrition*, 137:2493-2502.
- Rosenberg, M., Kopelman I. J., & Talmon Y. Y. 1985. A Scanning Electron Microscopy Study of Microencapsulation. *Journal of Food Science*, 50:139-144.
- Rosenberg, M., Kopelman, I. J., & Talmon, Y. Y. 1990. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 1288-1294 (Citado por: Gharsallaoui *et al.* 2007).
- Ryder, E. J. 1979. *Leafy salads vegetables*. Chap 5: Endive and Chicory. Westport, Connecticut. Avi Publishing Company, Inc..p. 177-194.
- Saénz, C., Tapia, S. Chávez, J., & Robert, P. 2009. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114: 616-622.
- Santos, A. B., Ferreira, V. P., e Grosso, C. R. F. 2000. Microcápsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulamento de produtos sensíveis à oxidação óleo:resina de paprika. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 3: 26-30 (Citado em: Meier *et al.*, 2006. Microencapsulamento – Inovação em diferentes áreas. *Health and Environment Journal*, 7: 12-20).
- Saulnier, D. M. A, Gibson, G. R., Spinler, J. K., & Versalovic, J. 2009. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhance functional foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 20: 135-141
- Shahidi, F., & Han, X. Q. 1993. Encapsulation of food ingredients. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 33: 501-547 (Citado por: Gharsallaoui *et al.* 2007).

Silva, R. F. 1996. Use of inulin as a natural texture modifier. *Cereal Food World*, 41: 792-795 (Citado por: Simão, 2004).

Simão, F. M. L. S. 2004. Caracterização Físico-Química da Inulina da Raiz da Chicória e da Raiz da Cherovia. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Alimentar, Universidade Técnica de Lisboa, ISA.

Suzuki, M., & Chattertan, N. J. (ed.) *Science and Technology of Fructans*, Boca Raton, FL, CRC Press, p. 119-139 (Citado por: Simão, 2004).

Selmer-Olsen, E., Sorhaug, T., Birkeland, S. E., & Pehrson, R. 1999. Survival of *Lactobacillus helveticus* entrapped in Ca-alginate in relation to water content, storage and rehydration. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 23: 79-85 (Citado por: Anal, A. K., & Singh, H. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotic for industrial applications and targeted delivery: *Review. Food Science & Technology*, 18: 240-251).

Toledo, I. R. T. R. 2008. Prebióticos e os benefícios de seu consumo na saúde. *Revista Brasileira de Nutrição*, 23: 119-126.

Toneli, J. T. C. L., Park, K. J., Murr, F. E. X & Negreiros, A. A. 2008. Effect of moisture on the microstructure of inulin powder. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28 (1): 122-131.

Toneli, J. T. C. L., Park, K. J., Ramalho, J. R. P., Murr, F. E. X., & Fabbro, I. M. D. 2008. Rheological characterization of chicory root (*Cichorium intubys* L.) inulin solutions. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 25: 461-471.

Truong, V. 2009. Optimization of Spray Drying of Sugar-Rich Foods In: Erdogdu, F. *Optimization in Food Engineering*, p.429–431.

Van Loo, J., Coussement, P., De Leenheer L., Hoebregs, H., & Smits G. 1995. On the presence of inulin and oligofructose as a natural ingredients in the Western diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35: 525-552 (Citado por: Orafti, 1996; Roberfroid, 2000).

Versic, R. J. 1988. Flavor encapsulation: an review (Citado por: Ribeiro, 2007).

Zakarian, A. J., & King, C. J. 1982. Volatiles loss in the zone during spray-drying of emulsions. *Industrial Engineering Chemistry Process Design and Development*, 21: 107-113 (Citado por: Gharsallaoui et al. 2007).

Referências cibergráficas

- [1] http://www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf_v06/bpol6014_439_448.pdf (visto a 08/01/09)
- [2] www.sensus.nl (visto a 01/03/09)
- [3] www.orafti.com (visto a 01/03/09)
- [4] www.cosucra.com (visto a 01/03/09)
- [5] www.FAO.com
http://www.fao.org/ag/AGN/agns/files/Prebiotics_Tech_Meeting_Report.pdf (artigo publicado e visto a 10/08/09)
- [6] <http://www.throppsnutrition.com/index.php?Inulation%20-%20Dietary%20Fiber> (visto a 10/08/09)
- [7] <http://faostat.fao.org> (visto a 10/08/09)
- [8] http://www.loja.jardicentro.pt/product_info.php?products_id=249 (visto a 25/09/09)
- [9] www.ifst.org (visto a 27/10/09)
- [10] www.clothoonline.com/ferzym.htm (visto a 10/09/09)
- [11] www.inulation.net (visto a 15/10/09)
- [12] <http://materialsscience.uoregon.edu/ttsem/SEMbasics.html> (visto a 02/09/09)
- [13] www.encyclopedia Britannica.com (visto a 02/09/09)

VI – ANEXOS